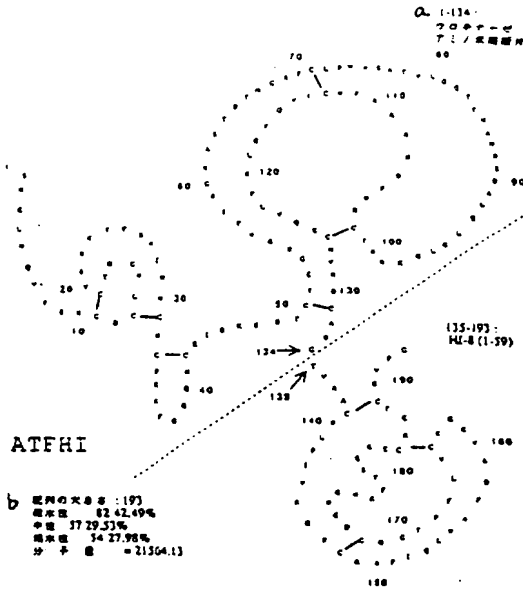




(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/435, C12P 21/02, C12N 1/21, A61K 38/57 // (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 21/02, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/25422 (43) 国際公開日 1997年7月17日(17.07.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00008 (22) 国際出願日 1997年1月6日(06.01.97) (30) 優先権データ 特願平8/1059 1996年1月8日(08.01.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) H清食品株式会社 (NISSIN FOOD PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒532 大阪府大阪市淀川区西中島四丁目1番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林 浩(KOBAYASHI, Hiroshi)(JP/JP) 〒431-31 静岡県浜松市有玉西町622-5 Shizuoka, (JP) 寺尾俊彦(TERAOKA, Toshihiko)(JP/JP) 〒431-31 静岡県浜松市半田町4872-29 Shizuoka, (JP) 杉野 男(SUGINO, Dan)(JP/JP) 〒520-01 滋賀県大津市唐崎4丁目2番1号 コーポ唐崎201 Shiga, (JP) 奥島 実(OKUSHIMA, Minoru)(JP/JP) 〒573 大阪府枚方市枚方元町8丁目9番地 Osaka, (JP)	(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: CANCEROUS METASTASIS INHIBITOR (54) 発明の名称 癌転移抑制剤 (57) Abstract A chimeric protein wherein HI-8 which is the C-terminal domain of human urinary trypsin inhibitor (UTI) having a cancer cell metastasis inhibitory effect is bonded to a peptide containing the G domain of urokinase binding specifically to urokinase receptor expressed in a large amount in cancer cells.  <p>a ... 1-134: amino terminal fragment of urokinase b ... sequence size : 193 hydrophobicity : 82 42.49 % neutrality : 57 29.53 % hydrophilicity : 54 27.98 % molecular weight : 21564.13</p>		

(57) 要約

本発明は、癌細胞転移抑制効果を持つヒト尿トリプシン阻害剤(urinary trypsin inhibitor: UTI)のC末端側ドメイン(domain)であるHI-8と、癌細胞に多量に発現されるウロキナーゼレセプター(urokinase receptor)に特異的に結合するウロキナーゼ(urokinase)のGドメインを含むペプチドを結合したキメラ蛋白質に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SK	スロバキア
BB	バハマ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	ジョージア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	TD	チャド
BJ	ベナン	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア	MK	マケドニア	TT	トリニダード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	UG	ウガンダ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	US	米国
CI	コート・ジボワール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KR	韓国	NL	オランダ	VN	ベトナム
CN	中国	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CO	コロンビア	KG	キルギス	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		

明細書
癌転移抑制剤

技術分野

5 本発明は、癌細胞転移抑制効果を持つヒト尿トリプシン阻
害剤(urinary trypsin inhibitor: UTI)のC末端側ドメイン
(domain)であるHI-8と、癌細胞に多量に発現されるウロキナ
ーゼレセプター(urokinase receptor)に特異的に結合するウ
ロキナーゼ(urokinase)のGドメインを含むペプチドを結合し
10 たキメラ蛋白質に関するものである。

従来技術

現在の癌治療においては、早期診断と治療法の進歩による
治癒率上昇の反面、癌転移に対する効果的な治療法はまだな
く、癌の転移抑制は大きな課題となっている。そして、近年
15 の積極的な研究により、癌細胞の転移に関する分子生物学的
な機構解明がなされ、癌細胞が正常組織に浸潤するためには、
様々なプロテアーゼの作用が必要であることが明らかになっ
てきた(1)(2)。セリンプロテアーゼ(serine protease)の
一種であるウロキナーゼ(urokinase-type plasminogen acti
20 vator: uPA)は細胞の癌化に伴って増加するプロテアーゼとし
て早くから注目され(3)、癌組織より抽出されるuPAの量は
一般的に癌細胞の悪性度と相関する事が報告されている(4)。

また、uPAやメタロプロテアーゼ(metalloprotease)であるコ
ラーゲナーゼ(collagenase)、ストロメリシン(stromelysin)
等の前駆体型酵素の分泌と、これらの前駆体型酵素の活性化
プロセスを含む蛋白質切断カスケード(cascade)が、癌細胞の
5 浸潤プロセスと密接に結びついていると考えられている(5)。
uPAは分子量55kDaの糖蛋白質で、N末端からグロースファクタ
ー様ドメイン(growth factor-like domain: G ドメイン)、ク
リングルドメイン(kringle domain: K ドメイン)、プロテア
ーゼドメイン(protease domain: P ドメイン)の三つのドメイ
10 ン構造からなる(図1参照)。Gドメインは細胞上の特異的受容
体であるウロキナーゼレセプター(urokinase receptor: uPA
R)に結合する部位で(6)、uPAはこのドメインを介して癌細
胞の膜上に結合し、浸潤における重要な役割を果たすと考え
られている(7)(8)(9)(10)(11)。また、癌細胞は移
15 動する先端方向にuPARを集めてuPAを結合し、この領域におけ
るuPA濃度を上げる(12)。この細胞膜結合uPAは膜表面上の
プラスミノゲン(plasminogen)などの各種プロテアーゼを活
性化し、細胞外マトリックスの分解を行う(13)(14)(15)。

また、内皮細胞の膜表面でuPAにより活性化されたプラスミ
20 ン(plasmin)は、壁細胞の表面に存在する潜在型TGF- β (tran
sforming growth factor β)を活性化することが知られてい
る(16)。TGF- β は、uPAの選択的阻害因子であるPAI-1(pla

sminogen activator inhibitor 1)の生産を誘導したり、あるいはuPAのmRNA発現を刺激することが知られており(17)、また濃度に応じて血管新生の様々な制御を行う。

これらのことから、癌細胞膜上のuPAの働きを阻害することにより、癌細胞の転移を抑制する実験が試みられてきた。uPAに対する抗体(18)やインヒビター(inhibitor)等の阻害剤(19)による浸潤抑制、またはuPAがuPARに結合することを阻害する抗体(21)やペプチド(22)(23)による浸潤抑制について報告されている。

ATF(amino-terminal fragment of uPA : residue 1-135 of uPA)は、uPARに結合するGドメインとそれに続くKドメインを含むポリペプチドであり、uPAがuPARへ結合することを競合阻害する。Crowley等は、このATFを含むuPAのN末端側137個のポリペプチドとイムノグロブリンG(immunoglobulin G)の定常領域(Fc region)を結合させたキメラ蛋白質を作製し、これがin vivo でのヒト癌細胞の転移を抑制することを報告した(24)。またLuらは、4つのグリシンをスペーサーとして介して、ATFとヒト血清アルブミン(human serum albumin: HSA)を結合したキメラ蛋白質を、酵母を用いて生産している。彼らはin vitro で、このキメラ蛋白質がuPARへ結合し、uPAの癌細胞膜への結合を阻害することを報告した(25)。これらのキメラ蛋白質は、uPA結合阻害作用を持つATFの特性を生体内

で安定化させ、転移抑制効果を高めるために作製された。

Ballance等は、uPAのGドメインとuPAのインヒビターである plasminogen activator inhibitor-2(PAI-2)、又はプラスミンインヒビターである α_1 -antitrypsin(α_1 -AT)とのキメラ蛋白質を、酵母で生産する方法について報告した(26)。

このキメラ蛋白質は、uPARに結合するGドメインの特性と転移に関与する酵素のインヒビターの特性を組み合わせ、抑制効果を高めようとしたものである。しかし、このキメラ蛋白質の転移抑制効果に関する実験データは報告されていない。

最近我々は、ヒト尿トリプシンインヒビター(urinary trypsin inhibitor: UTI)が、癌細胞の浸潤を抑制することを見いだした(27)。UTIはin vitroでの癌細胞の浸潤抑制効果(28)だけでなく、マウスのin vivoモデルでの転移抑制効果も示した(29)。また、セルピンファミリー(serpin family)に属するプラスミンインヒビターである α_2 -antiplasmin(α_2 AP)や α_2 -macroglobulin(α_2 M)は、細胞膜上のプラスミン活性を阻害しないが、UTIは細胞膜上のプラスミン活性を阻害し、癌細胞の浸潤を抑制することを見いだした(29)。

UTIは二つのクニッツ型(Kunitz-type)のインヒビタードメイン及び糖鎖から構成されており(図2)、プラスミン阻害部位はUTIのC末端側の第二ドメイン(residue 78-143 of UTI)であるHI-8(30)に存在する。我々は、このHI-8が転移抑制活

性を持つことを明らかにした(31)。さらに最近の研究から、HI-8はプロテアーゼ抑制作用以外の機序でも、浸潤や転移を抑制することが確認された。癌細胞表面にプラスミン活性の証明されていない細胞でも、HI-8により浸潤は抑制された。

- 5 HI-8は、プロテアーゼインヒビターとして作用するだけでなく、カルシウムイオンの流入抑制やプロテインキナーゼC (Protein Kinase C :PKC)活性の調整を介して、癌細胞の浸潤や転移を抑制していると考えられている。

- そこで我々は、このUTIあるいはHI-8を癌細胞に集積させて
10 抑制効果を上げるため、ATFとUTI、またはATFとHI-8を化学的に結合させた架橋化合物を作製した。そして、この架橋化合物がin vitro における癌細胞の転移を効果的に抑制することを発見した(32)。しかし、化学架橋化剤により合成された化合物は、様々な様式で架橋が起こっているため、単一構造
15 の物質を大量に生産することが難しいという、産業利用上の問題点が残されていた。

- 癌転移抑制剤は、手術によって原発巣を取り除いた後、あるいは外科的治療が困難な場合に行われる化学的療法に併用して投与される薬物となる。この場合、治療を受ける患者は
20 体力的に弱っており、毒性の強い薬物には耐えられない状態である。最近では、抗癌剤の副作用による自然治癒力の低下や、治療における患者のクオリティー・オブ・ライフ(Quali

ty of life)の問題から、化学療法剤に関する大きな見直しが行われている。

UTIは人尿中から精製された標品が、急性循環不全治療薬、
脾炎治療薬として医薬用途で利用されており、血中投与での
5 安全性がすでに確認されている蛋白質である (33) (34)
(35) (36)。HI-8は安全性が確かめられているUTIの一部分で
あるため、人への毒性が低い癌転移抑制剤として開発すること
が期待できる。一方uPAのGドメインは、転移性癌細胞に多
量に発現しているレセプター (uPAR) に結合する領域で、uP
10 Aが癌細胞に結合することを阻害して転移抑制作用を示すと同
時に、癌細胞への特異的結合分子としての作用を持つ。uPAも
すでに医薬化されており、その安全性についてよく研究され
ている物質である。これらのことから、このuPAのGドメイン
を含むポリペプチドとHI-8を結合させたキメラ蛋白質は、二
15 つの蛋白質の特性が組み合わされた効果的な癌転移抑制作用
を持つことが期待される。また、このキメラ蛋白質は、安全
性が確認されている二つの医薬品の特定機能に対する部分配
列だけを利用するため、毒性の低い癌転移抑制剤として応用
できると考えられる。さらに、このキメラ蛋白質を遺伝子工
20 学的手法により、一本のポリペプチド鎖を持つ単一構造物質
として大量生産できることは、癌転移抑制の研究および抑制
剤の開発に大いに寄与するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、ウロキナーゼ(uPA)の一次構造を示す(高橋敬、洪苑起(1991)、蛋白質核酸酵素、36、1705-1715の第1712頁の図7(1)より)。

5 図 2 は、UTIの一次構造を示す(米田雅彦、木全弘治; 生化学、67: 458-465、1995年の第459頁の図1(B)を一部改変した)。

図 3 は、キメラ蛋白質ATFHIの一次構造を示す。

図 4 は、合成DNAアダプター BamHI-TaqI DNA の構造を示す。

10 図 5 は、ATF部分をコードするuPAのcDNA構造とクローニングに利用したプライマーの位置関係を示す。

図 6 は、pCD17R15のHI-8遺伝子と、PCRによりHI-8の部分DNAを得るために利用したプライマーを示す。

図 7 は、プラスミドpTAKの構築手順を示す。

15 図 8 は、プラスミドpHIKの構築手順を示す。

図 9 は、プラスミドpAIPの構築手順を示す。

図10は、プラスミドpCD17R15構築のための合成HI-8DNAの配列を示す。

図11は、プラスミドpCD17R15の構築手順を示す。

20 図12は、キメラ蛋白質ATFHI-CLの一次構造を示す。

図13は、プラスミドpAIP-CLの構築手順を示す。

図14は、キメラ蛋白質ATFHI-MLの一次構造を示す。

図15は、プラスミドpAIP-MLの構築手順を示す。

図16は、キメラ蛋白質のプラスミン阻害(IC₅₀)効果を示す。

図17は、キメラ蛋白質のU937細胞への結合効果を示す。

発明の開示

5 我々はキメラ蛋白質のそれぞれのドメインが、本来の立体構造を維持できるように分子設計を行った。また、このキメラ蛋白質を大腸菌で効率良く発現するためのプラスミド設計を行った。大腸菌で発現させたキメラ蛋白質は、不溶性の封入体(inclusion body)として、菌体内に大量に蓄積させることができ、リホールディング(refolding)処理とその後の精製
10 操作で、キメラ蛋白質を立体構造の回復した単一物質として回収することができた。このキメラ蛋白質は、uPA由来のuPARに結合するGドメインの機能と、HI-8由来のプラスミン阻害機能の両方の特性を保持していた。さらに、in vitro の癌細胞浸潤抑制実験、および in vivo での転移抑制実験結果から、
15 このキメラ蛋白質がATFやHI-8よりも強い浸潤転移抑制活性を持つ事を確認した。

 本発明は、以下の癌転移抑制活性を持つキメラ蛋白質、キメラ蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有するプラスミド、該プラスミドを保持する形質転換体、該キメラ蛋白質
20 の製造方法及び癌転移予防方法を提供するものである。

項1. 下記(式1)の配列をN末端側に、下記(式2)の

配列を C 末端側に含むキメラ蛋白質：

(式 1)

Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser
Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys

5 (式 2)

Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly
Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg
Glu Tyr Cys

10 項 2. 前記 (式 1) と前記 (式 2) の配列の間に、下記の
4 種の配列のいずれかを含む介在配列をさらに含む項 1 記載
のキメラ蛋白質：

・ (式 3) - Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

・ (式 3) - Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

15 Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala；

・ Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala；及び

・ Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala。

項 3. 下記 (式 A)：

N末端-(配列 I)-(式 1)-(配列 II)-(式 2)-(配列 III)-C末端

20 (式 A)

〔 (式 A) 中、(式 1) および (式 2) は前記に同じ。〕

(配列 I) は、水素原子または下記のいずれかのアミノ酸配列

を示す：

Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
 Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
 Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
 5 Leu His Gln Val Pro Ser Asn
 His Gln Val Pro Ser Asn
 Gln Val Pro Ser Asn
 Val Pro Ser Asn
 Pro Ser Asn
 10 Ser Asn
 Asn

(配列II)は、下記の(式3)を含むグループおよび含まないグループから選ばれるいずれかの配列を示す：

- 15 ・(式3)を含むグループ
- (式3)- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala
 (式3)- Ala Asp Gly Val Ala Ala
 (式3)- Ala Asp Gly Ala Ala
 (式3)- Ala Asp Gly Xaa
 20 (式3)- Ala Asp Thr Val Ala Ala
 (式3)- Ala Asp Val Ala Ala
 (式3)- Ala Asp Ala Ala

- (式3)- Ala Asp Xaa
- (式3)- Ala Thr Val Ala Ala
- (式3)- Ala Val Ala Ala
- (式3)- Xaa Thr Val Ala Ala
- 5 (式3)- Xaa Val Ala Ala
- (式3)- Xaa Ala Ala
- (式3)- Xaa Xaa
- (式3)- Val Ala Ala
- (式3)- Xaa
- 10 (式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu
Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala
- ・(式3)を含まないグループ
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala
- 15 Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Xaa
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Xaa
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Ala Ala
- 20 Glu Ile Asp Lys Ser Thr Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Ala Ala

Glu Ile Asp Lys Ser Xaa
Glu Ile Asp Lys Thr Val Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Val Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Ala Ala
5 Glu Ile Asp Lys Xaa
Glu Ile Asp Thr Val Ala Ala
Glu Ile Asp Val Ala Ala
Glu Ile Asp Ala Ala
Glu Ile Asp Xaa
10 Glu Ile Thr Val Ala Ala
Glu Ile Val Ala Ala
Glu Ile Ala Ala
Glu Ile Xaa
Glu Thr Val Ala Ala
15 Glu Val Ala Ala
Glu Ala Ala
Glu Xaa
Xaa

(ただし、Xaaは、蛋白質を構成する任意のアミノ酸を示し、
20 式3はuPAの43～131に相当する以下の配列を示す。

(式 3)

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr
 Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp
 Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp
 Ala Leu Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
 5 Asn Arg Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu
 Val Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys

(配列 III)は、水酸基 (—OH) または下記のいずれかのアミノ酸配列を示す：

Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu
 10 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp
 Gly Val Pro Gly Asp Gly
 15 Gly Val Pro Gly Asp
 Gly Val Pro Gly
 Gly Val Pro
 Gly Val
 Gly
 20]

で表される配列を有する項 1 に記載のキメラ蛋白質。

項 4. 配列 II が、(式 3) を含むグループから選ばれる場合：

(式3)- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

又は

(式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala

5 であり、(式3)を含まないグループから選ばれる場合：

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala、

又は

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala

である項3記載のキメラ蛋白質

10 項5. 配列IがSer Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser As
n で表される項3記載のキメラ蛋白質。

項6. 配列IがSer Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser As
nで表され、かつ、

配列IIが(式3)を含むグループから選ばれる場合：

15 (式3)- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

又は

(式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala

であり、(式3)を含まないグループから選ばれる場合：

20 Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala、

又は

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala

である項 3 記載のキメラ蛋白質。

項 7. 下記 (式 1) の配列をコードする DNA 配列を 5' 側に、下記 (式 2) の配列をコードする DNA 配列を 3' 側に含むキメラ蛋白質をコードする DNA :

5 (式 1)

Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser
Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys

(式 2)

10 Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly
Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg
Glu Tyr Cys

項 8. 下記 (式 A) :

N末端-(配列 I)-(式 1)-(配列 II)-(式 2)-(配列 III)-C末端

15 (式 A)

[(式 A) 中、(配列 I)、(式 1)、(配列 II)、(式 2) および(配列 III)は前記に同じ。]

で表される配列を有するキメラ蛋白質をコードする項 7 に記載の DNA。

20 項 9. 項 7 または 8 に記載の DNA を含むプラスミド。

項 10. 項 9 のプラスミドを宿主細胞に導入してなる形質転換体。

項11. 項1～6のいずれかに記載のキメラ蛋白質を有効成分とする癌転移抑制剤。

5 項12. 項7または8に記載のDNAを組み込んだプラスミドを宿主細胞に導入して形質転換体とし、該形質転換体を培養し、培養物からキメラ蛋白質を回収することを含むキメラ蛋白質の製造方法。

項13. 項1～6のいずれかに記載のキメラ蛋白質の治療的有效量を癌患者に投与することを含む癌転移予防方法。

10 項14. 前記形質転換体がFERM BP-5293である項10記載の形質転換体。

項15. 前記形質転換体がFERM BP-5745である項10記載の形質転換体。

項16. 前記形質転換体がFERM BP-5746である項10記載の形質転換体。

15 項17. 配列番号1の1～193のアミノ酸配列を含む項1に記載の蛋白質。

項18. 配列番号2の1～200のアミノ酸配列を含む項1に記載の蛋白質。

20 項19. 配列番号3の1～207のアミノ酸配列を含む項1に記載の蛋白質。

項20. 配列番号1の15～593の核酸配列を含む項7に記載のDNA。

項21. 配列番号2の15～614の核酸配列を含む項7に記載のDNA。

項22. 配列番号3の15～635の核酸配列を含む項7に記載のDNA。

- 5 尚、Xaaで表される蛋白質を構成する任意のアミノ酸とは、天然の蛋白質を構成する20種類のアミノ酸のいずれかを示す。

以下、本発明を詳細に説明する。

- 本発明の目的とするキメラ蛋白質の特徴は、uPARに結合する特性(A)とプラスミン阻害活性の特性(B)を持った分子という点にある。特性(A)を発現するためには、uPAのGドメインによりレセプターに結合する性質が保持されていることが必要であり、この性質が保持されている限り、該Gドメインの配列(uPAの11番目のCysから42番目のCys)はアミノ酸の置換、付加、欠失などによって改変されていてもよい。

従って、本発明の特性(A)を発現するための配列は、下記のuPAのGドメインに対応するuPAの11番目のCysから42番目のCysまでの(式1)の配列、およびuPAのレセプター結合能を保持したその誘導体を包含する。

- 20 式1:

Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser
Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys

また、(B)の特性は、HI-8のクニッツ型ドメインによるものであり、該ドメインはHI-8の5番目のCysから55番目のCysまでの配列(式2)で特定することができる。該クニッツ型ドメインは、プラスミン等のトリプシン様酵素に対する阻害作用、
5 又はプロテインキナーゼCの抑制作用、あるいはカルシウムイオンの流入抑制作用に基づき癌細胞の転移抑制作用を発揮するものであり、これらの各種作用の少なくとも1つを保持し、癌細胞の転移抑制作用を保持する限り、アミノ酸の置換、付加、欠失などによって改変されていてもよい。従って、(式
10 2)の配列は、癌細胞の転移抑制作用を保持したその誘導体を包含する。

式2：

Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly
15 Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg
Glu Tyr Cys

前記(式1)と前記(式2)の配列は、ペプチド結合により直接連結させてもよいが、本発明のキメラ蛋白質は、前記
(式1)と前記(式2)の配列の間に、式(1)及び式(2)
20 の配列の立体構造(生物活性)にほとんどあるいは全く影響しないポリペプチドからなる介在配列を挿入するのが好ましい。該介在配列は、好ましくは、下記の4種類のアミノ酸配

列のいずれかを含むものが例示される：

- ・ (式3) - Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala
- ・ (式3) - Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu
Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala ;
- 5 ・ Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala ; 及び
- ・ Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala。

上記4種の介在配列と前記(式1)又は前記(式2)の間には任意の配列をさらに含めることができる。

- また、本発明の目的とするキメラ蛋白質はN末端側に(式1)
10 を持ち、C末端側に(式2)を持つポリペプチドで、次の(式A)で表すことができる。

(式A)：

- N末端-(配列I)-(式1)-(配列II)-(式2)-(配列III)-C末端
この式1と式2の両側のアミノ酸配列である配列I、配列IIお
15 よび配列IIIは、式1と式2のドメイン構造(立体構造)が互いに相互作用(interaction)せず、それぞれが持つ機能の特性を保持する限りどのような配列でも良いが、好ましくは人体に有害な抗原性を与えないと考えられるヒト由来の蛋白質に存在するアミノ酸配列が良い。配列Iは、ヒトuPAが本来持つN末
20 端配列(uPA; Ser¹~Asn¹⁰)が好ましいが、そのN末端から順次一つずつアミノ酸が欠損した9~1個のアミノ酸配列も配列Iに含まれる。さらに配列Iが水素原子である場合、つまりN

末端が式1から始まる場合も配列Iに含まれる。同様に配列I
IIは、HI-8が本来持つC末端配列(HI-8; Gly⁵⁶~Leu⁶⁶)が好ま
しいが、そのC末端から順次一つずつアミノ酸が欠損した10~
1個のアミノ酸配列も配列IIIに含まれる。さらに、配列III
5 は水酸基(-OH)を示す場合、つまりC末端が式2で終わる
場合も配列IIIに含まれる。

式1と式2をつなぐ配列IIは、二つの機能ドメインを連結
するためのスペーサー(spacer)の役割を果たす部分で、少な
くとも一つ以上のアミノ酸から成る配列である。二つのドメ
10 イン構造が互いに影響を持たないようにするためには、スペ
ーサー部位のアミノ酸配列は長く、フレキシブル(flexible)
な構造となる方が好ましいが、抗原性を考えると余分な配列
がない方が好ましい。配列IIは、式1のGドメインのC末端に続
く本来の配列(配列II-1: Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr)と、
15 式2のHI-8が本来持つN末端配列(配列II-2: Thr Val Ala Ala)
を連結した配列を考えることができる。また、配列II-1のC末
端から順次一つずつアミノ酸が欠損した7~0個のアミノ酸配
列と、配列II-2のN末端から順次一つずつアミノ酸が欠損した
4~0個のアミノ酸配列を、組み合わせて連結した配列(但し、
20 配列II-1のアミノ酸と、配列II-2のアミノ酸の数が同時に0
個になることはない)も考えられる。また配列IIは、式1のG
ドメインがレセプターに結合した時に、式2のHI-8のクニッツ

型ドメインが細胞膜の外側に配向できるような配列が好ましく、uPAのKドメインを含む配列(式3: uPA; Glu⁴³~Cys¹³¹)を
考えることができる。Kドメインは、ヘパリン等の負電荷を持
った分子に結合すると報告されており、GドメインのuPARへの
5 結合の安定化を行うとともに、KドメインのC末端を細胞膜の
外側へ配向させることができると考えられる。Kドメイン(式
3)を含む場合の配列IIは、式3および式3のC末端に続く本来の
配列(配列II-3: Ala Asp Gly)とHI-8のN末端配列(配列II-2
: Thr Val Ala Ala)を連結した配列が考えられる。また、配
10 列II-3のC末端から順次一つずつアミノ酸が欠損した3~0個の
アミノ酸配列と、配列II-2のN末端から順次一つずつアミノ酸
が欠損した4~0個のアミノ酸配列を、組み合わせて連結した
配列も考えられる(但し、配列II-3のアミノ酸と、配列II-2
のアミノ酸の数が同時に0個になることはない)。uPAの135
15 番目と136番目の間はプラスミンによって切断されることが知
られているが、これを含むC末端領域は、本来uPAのプロテア
ーゼドメイン(Pドメイン)とのスペーサとしての役割を持ち、
特色ある配列(Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu)を含
んでいる。この配列は、特定の立体構造を形成してスペーサ
20 ーとしての機能を発現するために有用であるとも考えられる
ので、配列IIには、uPAの43~147の配列とGlyを介してHI-8の
N末端配列(配列II-2: Thr Val Ala Ala)を連結した配列も考

えることができる。

好ましい（配列 I）は、

Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn で表される。

好ましい（配列 II）は、（式 3）を含むグループから選ばれ
5 る場合：

（式 3）- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

又は

（式 3）- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala

10 であり、（式 3）を含まないグループから選ばれる場合：

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala、

又は

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala

である

15 好ましい（配列 III）は、

・ Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu

又は

Gly Val Pro Gly

である。

20 以上のような観点から、設計できるキメラ蛋白質の例とし
て、N末端側は134個のuPA由来の配列(ATF)を有し、C末端側は
59個のHI-8由来の配列を有する合計193個のアミノ酸から成る

新規ポリペプチドを提供することができる（図3）。このキメラ蛋白質は、計算上、分子量は21,564と予測される。以後、このキメラ蛋白質をATFHI（配列番号1に示される）と呼ぶことにする。

- 5 本発明に包含される他の好ましいキメラ蛋白質を、配列番号2及び配列番号3に示す。

尚、蛋白質の生化学的性質についての解析計算、あるいは核酸配列に関する解析は、GENETYX(ソフトウェア開発)のような解析ソフトを用いて行うことができる。

- 10 次に本発明の蛋白質の製造方法を、ATFHIを例に取り、以下に述べる。このキメラ蛋白質ATFHIを大量に生産する為の宿主細胞として、酵母、哺乳動物細胞などの真核生物細胞の他に大腸菌のような原核生物細胞を利用することが可能である。一般に大腸菌で目的蛋白質を発現させる場合、適当なシグナル配列を用いてペリプラズム(periplasm)画分へ分泌させる方法と、細胞質内の封入体として直接発現させる方法がある。ペリプラズムへ分泌させる場合は、目的物質が立体構造を持った可溶性蛋白質として得られる可能性があるが、ペリプラズム内での分泌量は少なく、またプロテアーゼによる切断を受けやすいといった問題がある。一方、細胞質内に直接発現させる場合には、蓄積される不溶性蛋白質封入体(インクルージョンボディ: inclusion body)を、蛋白質可溶化剤で一旦可
- 15
- 20

溶化して、リホールディング(refolding)と呼ばれる操作で、立体構造の再構築を行う必要がある。しかし、この封入体画分のほとんどが目的物質であり、精製が容易で大量生産しやすいことから、細胞質内への直接発現法はよく用いられている方法である。またこの場合、開始メチオニンコドンの直後に目的産物をコードするDNA配列を連結するため、発現された目的物質のN末端メチオニンを除去する必要があるが、細胞質内の新生蛋白質のほとんどは、メチオニンアミノペプチダーゼ(methionine aminopeptidase: MAP)によりN末端メチオニンが除去されることが知られている。このペプチダーゼによる切断は、開始メチオニンの次に位置するアミノ酸の種類により大きく影響を受けることも知られている(37)。uPAのN末端アミノ酸はセリンであるが、このような側鎖の短いアミノ酸が開始メチオニンに続く場合はMAPによる切断を受けやすい。

このため、大腸菌を用いたuPAの直接発現の場合でも、N末端メチオニンは除去されることが報告されている(38)。これらの事からATFHIの場合も、大腸菌を用いた直接発現法で、生産させることができると考えられる。ただし、メチオニンに隣接するアミノ酸にセリン以外を選択した場合であっても、メチオニンの除去は可能である。

次に、キメラ蛋白質を大腸菌で発現するプラスミド構築方法について述べる。材料となるDNAは配列が既知でありさえす

れば、近年のDNA合成機の高性能化と普及によって、化学合成法を用いて容易に作製することができる。また、cDNAライブラリーを作製してスクリーニングによりcDNAを得る場合も、市販のキットを利用して容易に行える。さらに、PCR法を用い
5 るDNAクローニング用キットや、様々な種類の遺伝子ライブラリーも市販品を利用して、uPAやUTIの必要な部分のDNAを容易にクローニングすることができる。

uPAのcDNAは既にクローニングされており、その遺伝子構造はHeyneker等により明らかにされた(39)。また、微生物や
10 動物細胞を用いてuPAやその変異体を生産する方法も報告されている(40)(41)(42)(43)。これらの報告に記載されたcDNA配列を参考として、必要な部分のDNAを化学的に合成したり、あるいは適当な遺伝子ライブラリーからuPAのcDNAを容易に得ることができる。また次のようにPCR法で、ATF部分をコードする
15 uPAの部分cDNAをクローニングすることができる。まず、uPAの遺伝子配列からATF周辺を含むDNA配列で、PCR増幅に適当なプライマー部位を(GC含量50%前後で、PCRに用いる二つのプライマーの T_m が同じになるように)選択する。次に、uPAを発現しているヒトの組織材料(例えば、腎臓)由来のmRNAから作
20 製したcDNAを鋳型として、PCR法を用いてuPAの部分DNA断片を増幅する。そしてこれを市販のクローニング用キットを用いて、適当なベクター中に挿入し、大腸菌でクローニングする。

こうして得られたATFをコードするDNAを含むプラスミド(例えばpPPA)を、発現プラスミド構築のための出発材料として用いることができる。

- HI-8(UTI)の遺伝子構造も既に報告されており(44)、ATFと同様のクローニング法で出発材料となるDNAを得ることができる。あるいは、特開平 6-247998に記された、大腸菌での発現に適したHI-8DNA配列を含むプラスミド(pCD17R15)を利用することができる。このプラスミドは、大腸菌でHI-8の変異体を生産するために、大腸菌での使用頻度が高いコドンに変換したDNA配列を有している。これらのプラスミドを材料として、ATFHIのDNAを作製するためには、PCR法で必要なDNA断片を得ると同時に、適当な制限酵素部位を事前に導入して、効率を上げることが大切である。また、次に述べるような大腸菌での発現効率を上げるためにも、制限酵素部位と合成DNAを上手に組み合わせて作製していく必要がある。

- 大腸菌で目的蛋白質を大量生産させるためには、増幅数(コピー数)が多いプラスミドを利用することや、発現に最適なプロモーター(promoter)配列やターミネーター(terminator)配列を利用することが重要である。また、リボソーム結合部位のSD配列(Shine-Dalgarno sequence)から翻訳開始コドンATGまでの領域(SD-ATG)のDNA配列及びその長さ、あるいは翻訳開始点近傍のmRNAの高次構造が生産性に影響を与える(38)。翻

訳開始点付近のmRNAの高次構造は、それに続くN末端アミノ酸配列部分をコードするDNA配列の影響を受ける。従って発現プラスミドを設計する場合は、SD-ATG間を含むN末端配列付近のmRNA高次構造のポテンシャルエネルギー(potential energy)値を考慮することが重要である。そこで、発現プラスミドのSD-ATG間と数個のN末端アミノ酸配列をコードするDNAを化学合成し、これを天然のcDNA配列と置き換えて、最適なmRNA構造に変換することができる。uPAのcDNAには、N末端アミノ酸から9番目のセリンをコードするコドン上に制限酵素TaqI切断部位が存在する。このTaqI部位より5'側のDNAを化学合成し、天然のDNA配列と置換することができる。また、プロモーターとしては、強力なtacプロモーターがよく用いられているが、市販のtacプロモーター配列(tac promoter GenBlock, Pharmacia)等を利用することができる。これには、3'側にSD配列(Shine-Dalgarno sequence)を含むBamHI粘着末端(cohesive end)配列が含まれている。この粘着末端と先のTaqI部位を利用して、BamHIとTaqIの間のDNAを化学合成し、大腸菌での発現に適したDNA配列に置き換えることが可能である(図4)。

キメラ蛋白質ATFHIをコードするDNAは、ATFとHI-8の二つのDNA断片を制限酵素認識部位を介して連結することができる。結合部位のアミノ酸配列は、ATFの134番目のGlyとHI-8の1番目のThrである。このGly-Thrに対応するコドンからKpnI認識

部位を創生することができる。このKpnI認識部位は、ATFHIのキメラ遺伝子中にはこれ以外に存在しないため、ATFとHI-8部分の連結部位を特異的に認識切断する部位として利用することができる。

- 5 次に、実際のプラスミド作製手順を記す。まず、ATFやHI-8DNAの出発材料となる前記プラスミドpPPAやpCD17R15を鋳型として、変異プライマーを利用したPCR法で、必要なDNA断片の加工を行う。そして、次のような二つの中間プラスミドを作製してから、発現プラスミドを構築する。
- 10 ATF部分(Ser¹~Gly¹³⁴)をコードするDNA断片を持つ中間プラスミドpTAKは次のようにして作製することができる。プラスミドpPPAを鋳型としてPCR増幅する場合、5'側のプライマーはTaqI認識部位より上流(5'側)の適当なDNA配列を選び、3'側はATFの3'側にKpnI認識部位を作製できるようなプライマー
- 15 ーを利用する(図5)。得られたPCR増幅DNAをTaqIとKpnIで切断することにより、それぞれの制限酵素粘着末端を持ったDNA断片を得ることができる。このDNA断片とtacプロモーター配列を持つHindIII-BamHIアダプター、および大腸菌での翻訳効率を上げる目的で化学合成したBamHI-TaqIアダプターをpUC19のHindIII-KpnI部位に挿入し、中間プラスミドpTAKを作製
- 20 することができる(図7)。

HI-8部分(Thr¹~Gly⁵⁹)をコードするDNA断片を持つ中間プ

- ラスミドpHIKは、次のようにして作製することができる。pC
D17R15がコードしているHI-8のアミノ酸配列は、9番目と10番
目のアミノ酸が報告されているcDNA配列から予測されるアミ
ノ酸と異なっているが、変異しているHI-8の9番目のアミノ酸
5 ValをIleに変換し、10番目のIleをValへ変換するプライマー
を利用したPCR増幅により、cDNAと同じ配列のDNA断片を得る
ことができる（図6）。またその5'側は、ATFの3'側と連結で
きるように新たにKpnI部位を導入する。さらに3'側は、制限
酵素BclI認識部位を創生するように設計されたプライマーを
10 利用して、HI-8の59番目のGlyの直後に終止コドンTGAを導入
する。このPCR増幅したDNAを、KpnIとBclIで切断すること
により、それぞれの粘着末端を持ったDNA断片を得ることが
できる。これを、pUC18のKpnI-BamHI部位へ挿入し、中間プラスミ
ドpHIKを作製することができる（図8）。
- 15 二つの中間プラスミドpTAKとpHIKを、KpnIとXmnIで切断し、
それぞれ必要なDNA断片を精製する。そして、ライゲーション
によりこれらの断片を連結し、キメラ蛋白質ATFHIを大腸菌で
生産するための発現プラスミドpAIPを作製することができる
（図9）。
- 20 この発現プラスミドpAIPを導入した宿主細胞、例えば大腸
菌（例えばJM109）の形質転換株を用いて、キメラ蛋白質を生産
させることができる。この形質転換株を培養し、適当な時間

にIPTG(Isopropyl β -D- Thiogalactopyranoside)を添加することによりATFHIの生産を誘導する。大腸菌では、ATFHIは封入体の形で生産される。よく知られている封入体の精製方法とリホールディング操作法により、ATFHIの立体構造を再構築
5 することができる。再構築されたATFHIは、通常の蛋白質の精製方法、例えばイオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過のような方法を組み合わせて精製することが可能である。

本発明のキメラ蛋白質は、癌転移抑制剤として使用することができる。該キメラ蛋白質は、静注、筋注、皮下、皮内、
10 腹腔内に投与される注射剤、肺に投与する吸入剤、経口剤、坐剤、貼付剤、液剤等として投与することができる。該製剤に添加される担体は、当該分野で通常用いられているものであれば、全て用いることができる。投与量は投与経路、患者の年齢、性別、症状、対象とする癌の種類等により異なるが、
15 例えば注射剤としては成人男子一日当たり0.1～200mg程度を投与することができる。

転移が抑制される癌の種類としては、例えば白血病、肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌、食道癌、結腸癌、直腸癌、悪性リンパ種、卵巣癌、子宮頸癌、脳腫瘍、骨肉腫、皮膚癌、乳癌、前
20 立腺癌等が挙げられる。

ヒトに対する毒性が低くかつ強い癌浸潤転移抑制効果を有する新規の癌転移抑制剤を作製する事ができ、癌の治療にお

いて極めて有用な薬剤を提供することができた。

発明を実施するための最良の形態

参考例1. プラスミドpPPAの作製

市販のヒトcDNAからATFをコードするDNAを、PCR法を用いて
5 増幅し大腸菌にクローニングした。ヒト腎臓由来のcDNAs(QU
ICK-Clone cDNA, CLONTECH)を鋳型として、合成プライマー
Pr-1(5'-CGTGAGCGACTCCAAAGGCAGCAATG-3', 配列番号: 4)と
Pr-2(5'-AAACCAGGGCTGGTTCTCGATGGTGGTG-3', 配列番号: 5)
(図5)を用いてPCR反応を行った。PCR反応は、1ngのcDNAと
10 50pmolずつのプライマーを含む100 μ lの反応系で、市販のPC
R反応キット(Gene Amp, Perkin Elmer Cetus)を利用した。9
4°C1分間、55°C2分間、72°C3分間を1サイクルとして30サイク
ルのPCRを行い、増幅された538bpのDNAを分離精製してPCR産
物クローニングキット(TA Cloning Kit, Invitrogen)を用い
15 てベクターpCR II(Invitrogen)に組み込んだ。キットのマニ
ュアルに従い、ライゲーション反応と形質転換を行い、得ら
れた形質転換大腸菌から保持するプラスミドをアルカリ法(羊
土社, 遺伝子工学ハンドブック, pp. 19-26, 1991)に従って精
製した。そして、制限酵素切断パターンとDNAの塩基配列をD
20 NAシーケンサー(ALF DNA Sequencer, Pharmacia)を用いて
調べ、目的プラスミドpPPAが正しく構築されている事を確認
した。

参考例2. プラスミドpCD17R15の作製

図10に示した塩基配列(1)から(10)の各オリゴヌクレオチド(配列番号: 17、18)を、全自動DNA合成機(Model 381A, Applied Biosystems)を用いてホスホアミダイド法により化学合成した。濃アンモニア水中、55℃で一晩加温することにより保護基をはずし、オリゴヌクレオチド精製用逆相カラム(OPCカートリッジカラム, Applied Biosystems)を用いて精製した。さらに必要に応じて、16ユニットのポリヌクレオチドキナーゼ(TOYOBO)を含む50mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM MgCl₂, 0.5mM ジチオスレイトール(DTT), 1mM ATP 溶液中で37℃で1時間の反応を行い、合成DNAの5'末端の磷酸化を行った。次に、7M尿素を含むゲル濃度20%のポリアクリルアミドゲル電気泳動(polyaclyramide gel electrophoresis: PAGE)による分離を行った。ゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、長波長(365nm)紫外線発生器上で、目的部分のオリゴヌクレオチドを含むバンド部分を切り出した。ゲルを粉碎し、1mlのDNA溶出溶液(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5mM EDTA)を加え、37℃で一晩振盪し遠心分離後、上清を脱塩カラムに通して合成オリゴヌクレオチド溶液を得た。図10の相補的な上下の鎖、例えば塩基配列(1)と塩基配列(6)の合成オリゴヌクレオチドがそれぞれ等モルになるよう、50mM Tris -HCl(pH7.6), 10mM MgCl₂ 中で混合し、その溶液を90℃で5分間処理した。

その後、室温までゆっくりこれを冷却放置し、DNAのアニーリングを行った。そして、アニーリングした合成DNA断片を、尿素を含まないゲル濃度10%のPAGEを用いて分離し、ゲルから切り出し精製した。

- 5 プラスミドpTV118N(TAKARA)を制限酵素EcoRIおよびKpnIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分離後、目的のDNAバンドを切り出した。このゲル断片を-80℃で1時間凍結させた後37℃まで急激に加温し、孔径0.1 μ mの遠心分離型フィルター(Millipore)で濾過した。
- 10 濾過した溶液をフェノール抽出後、エタノール沈澱を行い、DNA断片を精製した。このDNA断片とアニーリングした5組の合成DNA断片を、50mM Tris-HCl(pH7.6), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP の溶液中で混合し、10ユニットのT4 DNA リガーゼ(TAKARA)を用いて、4℃で一晩、連結反応を行った。市販
- 15 の大腸菌JM109コンピテントセル(TAKARA)を用いて形質導入を行い、形質転換された大腸菌から、プラスミドを分離精製して、目的プラスミドを選び出した。そして、制限酵素切断パターンとDNA塩基配列解析により、目的プラスミドの構造を確認した。このようにして得られたプラスミドをpEK7と名付けた(図11)。また、次の二本の合成DNAは互いの相補鎖で、
- 20 その5'末端にBspHI粘着末端と3'末端に平滑末端を保持する二本鎖DNAを形成する。

5' -CATGAAAAAACCCTATCGCTATCGCTGTTGCTCTGGCTGGTTTTGCTAC
CGTTGCTCAGGCC-3', 配列番号 : 6

5' -GGCCTGAGCAACGGTAGCAAAACCAGCCAGAGCAACAGCGATAGCGATAGC
GGTTTTTTT-3', 配列番号 : 7

- 5 このDNA断片は、大腸菌外膜蛋白質 A (OmpA) のシグナルペプチ
ドのアミノ酸をコードしている。上述した方法を用いて構築
したこのDNA断片と、プラスミド pEK7 を制限酵素 RsaI と EcoRI
で切断して生じる 0.25kb の DNA 断片を、pTV118N の NcoI-EcoRI
部位へ導入するため、先に示した方法で連結反応を行った。
- 10 前記した方法に従って大腸菌の形質転換を行い、得られた大
腸菌からプラスミドを分離精製した。そして、プラスミドの
制限酵素切断パターン解析、および DNA の塩基配列解析から、
目的とするプラスミド pCD17R15 が得られていることを確認し
た。

15 実施例 1

発現プラスミドの構築

(1) pTAK plasmid の構築 (図 7)

- プラスミド pPPA を鋳型として、PCR により必要な部分の DNA
を得るための加工を行った。合成プライマー Pr-3 (5' -GGGTAC
20 CATCTGCGCAGTCATGCAC-3', 配列番号 : 8) は、PCR の結果、AT
F をコードする DNA の 3' 側に KpnI 部位を創生するために設計さ
れた (図 5)。プラスミド pPPA 10ng と、プライマー Pr-1 およ

びPr-3を100pmolずつ含む100 μ lの反応系で、94℃1分間、50℃1分間、72℃3分間を1サイクルとして25サイクルのPCR反応を行った。増幅されたPCR産物をエタノール沈殿により精製し、制限酵素TaqIとKpnIで切断して、1.5%のアガロースゲル電気泳動で分離した。ゲルから379bpのDNA断片を切り出し、DNA回収用フィルター付遠心チューブ (SpinBind DNA Extraction Units, FMC BioProducts)を用いてDNAを回収した。この379bpのDNA断片は、uPAの10～134番のアミノ酸配列をコードしている〔図7-(3)〕。

また、大腸菌で目的産物が効率良く発現するように、開始Metから続くATFのN末端1～9番目までのアミノ酸配列をコードするDNAを化学合成した。次の二本の合成DNAは互いの相補鎖で、その5'側にBamHI粘着末端を、3'側にはTaqI粘着末端を形成する。

5' -GATCCAATCAAATGAGTAATGAACTACATCAAGTACCAT-3', 配列番号:9

5' -CGATGGTACTTGATGTAGTTCATTACTCATTTGATTG-3', 配列番号:10

上記合成DNAの5'末端をそれぞれ、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(TAKARA)とATPを用いてリン酸化し、100℃で2分間煮沸後、自然冷却によりアニーリングさせ、アダプターDNAを形成させた。このBamHI-TaqIアダプターは、11塩基の5'非翻訳配列、

開始コドンおよびそれに続くATFの最初の9個のN末アミノ酸配列をコードしている〔図7-(2)〕。pUC19をKpnIとHindIIIで切断後バクテリア・アルカリ・ホスファターゼ(BAP, TAKARA)により脱リン酸化したDNA断片を100ng、tac プロモーターDNAアダプター(tac promoter GenBlock, pharmacia)を20pmol、BamHI-Taqlアダプターを20pmolおよび379bpのTaq-KpnI DNA断片200ngを、市販のDNAライゲーションキット(DNA Ligation Kit Ver.2, TAKARA)を用いてライゲーションし、大腸菌JM109コンピテントセル(E. coli JM109 Competent Cells, TAKARA)に導入して形質転換株を得た。そして、得られた形質転換株からプラスミドを調整し、制限酵素切断パターンとDNA塩基配列解析により、目的プラスミドpTAKが得られていることを確認した。

2. pHIK plasmid の構築 (図8 参照)

15 プラスミドpCD17R15は、大腸菌で効率良く発現するように大腸菌での使用頻度が多いコドンに変換したHI-8変異体のDNA配列を有する(特開平6-247998, 図11)。このプラスミド中にコードされたHI-8のアミノ酸配列は、9番目と10番目、および61番目のアミノ酸が、報告されているcDNA配列から予測されるアミノ酸と異なっている。そこでPCR反応を用いて、ATF
20 とHI-8のDNAをKpnIで連結するために、HI-8の5'側を修飾すると同時に9番目のValをIleへ変換し、10番目のIleをValへ変換

するためのプライマーPr-4(5'-GGGTACCGTTGCTGCTTGCAACCTGC
CGATTGTCCG-3', 配列番号: 11)を設計した。また、HI-8の
59番目のGlyの直後に終止コドンTGAを導入し、同時にBclI認
識部位を持つようにDNAを修飾するためのプライマーPr-5(5'
5 -GTGATCAACCCGGAACACCGCAATATTCACGG-3', 配列番号: 12)を
設計した(図6)。鋳型DNAとしてプラスミドpCD17R15を10ng、
プライマーPr-4およびPr-5を100pmolずつ100 μ lの反応系で、
94 $^{\circ}$ C 1分間、50 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 3分間を1サイクルとする25サイ
クルのPCR反応を行った。増幅されたPCR産物をエタノール沈
10 殿により回収後、KpnIとBclIで切断し、176bpのDNA断片を得
た〔図8-(1)〕。pUC18をKpnIとBamHIで切断後、BAP処理によ
り脱リン酸化してベクターDNAを調整した〔図8-(2)〕。この
ベクターDNAを100ngと176bpのDNA断片200ngをライゲーション
キットを用いてライゲーションした〔図8-(3)〕。これを、
15 大腸菌JM109コンピテントセルに導入して形質転換株を分離し、
得られた株からプラスミドを調製してDNAの塩基配列解析を行
い、目的プラスミドpHIKが設計通りに構築されていることを
確認した。

3. 発現プラスミドpAIPの構築 (図9)

20 前記プラスミドpTAKおよびpHIKを、KpnI及びXmnIでそれぞ
れ切断し、1.0%のアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、
pTAKから得られる2356bpのDNA断片〔図9-(1)〕とpHIKから得

られる997bpのDNA断片〔図9-(2)〕を精製した。次に、各DNA断片100ngずつを混合し、ライゲーションキットを用いてライゲーションした〔図9-(3)〕。そして、大腸菌JM109コンピテントセルに導入して形質転換株を分離した。得られた形質転換株からプラスミドを調製し、塩基配列を調べることにより、発現プラスミドpAIPが設計通りに構築されていることを確認した。なお、pAIPを保有する大腸菌JM109株は、平成7年11月15日に、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5293 として、国際寄託された。

10 実施例2 大腸菌によるキメラ蛋白質の発現

プラスミドpAIPを持つ大腸菌JM109形質転換株を、5mlの100 μ g/mlのアンプシリン(Amp)を含むTerrific Broth(TB培地；1.2% バクトトリプトン，2.4% 酵母エキス0.4% グリセロール， KH_2PO_4 2.31g/l， K_2HPO_4 12.54g/l)に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。この培養液を新しい50mlのTB培地(100 μ g/ml Amp)に移し、さらに4時間前培養した。次に、400mlのTB培地(100 μ g/ml Amp)に移し培養を継続した。OD₆₀₀(600nm での培養液の吸光度)が約0.5となった時にIPTGを最終濃度0.5mMとなるように添加し、さらに一晩培養した。

20 菌体を遠心分離(10,000×g、5分)により集め、lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA)で洗浄した。そして遠心分離を用いて菌体を集め、0.25 mg/mlのリゾ

チームを含むlysis buffer 50mlに再懸濁した。0℃で1時間放置した後、菌体の超音波破碎を行い、次に破碎溶液を遠心分離(4,400×g、5分)にかけて、不溶性沈澱画分を得た。この沈澱画分をlysis bufferで洗浄し、次に0.5% Triton X-100, 10mM EDTA(pH 8.0)水溶液で洗浄し、最後にもう一度lysis bufferで洗浄して、封入体画分を精製した。

この封入体画分を6 M 塩酸グアニジン、50mM Tris-HCl(pH 7.0)、1mM EDTA、1% 2-mercaptoethanolの溶液20mlに溶解した後、1リットルのリホールディングバッファー(1M 塩酸グアニジン、50mM Tris-HCl, pH7.0、1mM EDTA、2mM 還元型グルタチオン、0.2mM 酸化型グルタチオン)を加えて、室温で一晩放置した。次に、このリホールディング溶液に対し20mM リン酸バッファー(pH 6.5)を外液として十分な透析を実施した。

透析されたリホールディング溶液中の不溶物をワットマン No. 2ろ紙で除き、さらに0.22μmのフィルターによる濾過を行った。得られた溶液を、20mM リン酸バッファー(pH6.5)で平衡化したイオン交換メンブレン・クロマトグラフィー・カートリッジ(SP MemSep 1000, MILLIPORE)に添加し、0~1M塩化ナトリウム(20mM リン酸バッファー, pH6.5)溶液を用いた直線濃度勾配により、吸着画分を溶出した。この画分を遠心限外濾過器(Centriplus concentrators ; 分画分子量3,000, A

micon)を用いて濃縮し、0.2M NaCl, 50mM リン酸バッファー (pH6.5)で平衡化したSuperdex75(HiLoad 26/60, Pharmacia) に添加して、ゲル濾過を行った。280nmの吸光度のピーク画分を集め、20mM リン酸バッファー(pH6.5)を外液として透析した。そしてこの溶液を、あらかじめ20mM リン酸バッファー (pH6.5)で平衡化したイオン交換カラム(RESOURCE S, Pharmacia)に添加し、0~0.5M塩化ナトリウム(20mM リン酸バッファー, pH6.5)溶液の直線濃度勾配により、吸着しているATFHIのクロマト溶出を行った。

10 実施例 3 精製ATFHIの確認

精製したATFHIを20% SDS-PAGEで調べたところ、アミノ酸配列から計算で求められる分子量の21.5kDaと一致した大きさに、単一バンドとして確認することができた。また、泳動ゲル内の蛋白質をウェスタンプロット法によりメンブレンに転写し、HI-8に対する抗血清との反応性を調べたところ、この21.5kDaの蛋白質バンドが強く反応することが確認された。さらに、そのN末端アミノ酸配列についてプロテインシーケンサー(Model 477A, Applied Biosystems)を用いて調べた結果、期待されるATFHIのN末端配列である、Ser-Asn-Glu-Leu-His-Gln-Val-Pro-Ser-Asn-(Cys)-Asp-(Cys)-Leu-の14残基のうちのCysを除く配列を確認することができた。またこの結果から、大腸菌でATFHIが菌体内に直接発現された場合も、予測通り開始メ

チオニンは除かれることが確認された。

実施例 4 キメラ蛋白質ATFHI-CLの作製

ATFHI-CLは、N末端側にuPAの1～134番目までのアミノ酸配列(Ser¹～Gly¹³⁴)のポリペプチドを有し、C末端側にHI-8の全
5 長である66残基のアミノ酸配列(Thr¹～Leu⁶⁶)のポリペプチド
を有するキメラ蛋白質である(図12, 配列番号:2)。このキ
メラ蛋白質を大腸菌で生産するための発現プラスミドpAIP-C
Lを以下の方法に従って作製した(図13)。プラスミドpAIPを
制限酵素BsmIとXbaIで切断し、BAP処理により脱リン酸化した。
10 そして、1%のアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、332
3bpのDNA断片を切り出し精製した〔図13-(1)〕。次の二本
の合成DNAは互いの相補鎖で、その5'側にBsmI粘着末端を、3
'側にはXbaI粘着末端を形成する。

5' -GTGAATATTGCGGTGTTCCGGGTGATGGTGATGAAGAACTGCTGTGATCCT
15 -3', 配列番号:13

5' -CTAGAGGATCACAGCAGTTCTTCATCACCATCACCCGGAACACCGCAATAT
TCACGG-3', 配列番号:14

化学合成した上記DNAの5'末端を、T4ポリヌクレオチドキ
ナーゼ(TAKARA)とATPを用いてそれぞれリン酸化し、100℃で
20 2分間煮沸後、自然冷却によりアニーリングさせ、アダプター
DNAを形成させた〔図13-(2)〕。このBsmI-XbaIアダプター
DNAを10pmolおよび3323bpのDNA断片100ngをライゲーションキ

ットによりライゲーションした〔図13-(3)〕。そして、大腸菌JM109コンピテントセルに導入して形質転換株を分離した。得られた形質転換株からプラスミドを調製し、塩基配列を調べることにより、目的のプラスミドpAIP-CLが設計通りに構築されていることを確認した。なお、pAIP-CLを保有する大腸菌JM109株は、平成7年12月22日に、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15364として国内寄託され、平成8年11月14日に、FERM BP-5746として国際寄託に移管された。このプラスミドを持つ大腸菌を培養し、実施例2の手法に従ってキメラ蛋白質ATFHI-CLを精製した。精製したATFHI-CLを20% SDS-PAGEで調べたところ、計算から求められる22.3kDaの分子量と一致した大きさに、単一バンドとして確認された。また、泳動ゲル内の蛋白質をウェスタンブロット法によりメンブレンに転写し、HI-8に対する抗血清との反応性を調べたところ、この22.3kDaの蛋白質バンドが強く反応することが確認された。

実施例5 キメラ蛋白質ATFHI-MLの作製

ATFHI-MLは、N末端側にuPAの1～147番目までのアミノ酸配列(Ser¹-Gln¹⁴⁷)のポリペプチドを有し、Glyを介してC末端側にHI-8の1～59番目までのアミノ酸配列(Thr¹-Gly⁵⁹)のポリペプチドを有するキメラ蛋白質である(図14, 配列番号:3)。このキメラ蛋白質を大腸菌で生産するための発現プラスミドpAIP-MLを以下の方法に従って作製した(図15)。

プラスミドpPPAを制限酵素ApoIおよびNcoIで切断した後、3%のアガロースゲル電気泳動で分離した。ゲルから、236bpのDNA断片を切り出し精製した〔図15-(1)〕。また、プラスミドpAIPをNcoIおよびKpnIで切断し、1%のアガロースゲル電気泳動で分離し、3146bpのDNA断片を切り出し精製した〔図15-(2)〕。次の二本の合成DNAは互いの相補鎖で、その5'側はApoI粘着末端、3'側にはKpnI粘着末端を形成する。5'-AATTT CAGGGTAC-3' (配列番号: 15), 5'-CCTAG-3' (配列番号: 16) で示される化学合成した上記DNAの5'末端を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(TAKARA)とATPを用いてそれぞれリン酸化し、100℃で2分間煮沸した後、自然冷却によりアニーリングさせ、アダプターDNAを形成させた〔図15-(3)〕。このApoI-KpnIアダプターDNAを30pmolと236bpおよび3146bpのDNA断片100ngずつをライゲーションキットによりライゲーションした〔図15-(4)〕。そして、大腸菌JM109コンピテントセルに導入して形質転換株を分離した。得られた形質転換株からプラスミドを調製し、塩基配列を調べることにより、目的のプラスミドpAIP-MLが設計通り構築されていることを確認した。なお、pAIP-MLを保有する大腸菌JM109株は、平成7年12月22日に、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15363として、国内寄託され、平成8年11月14日にFERM BP-5745として国際寄託に移管された。このプラスミドを持つ大腸菌を培養し、

実施例2の手法に従ってキメラ蛋白質ATFHI-MLを精製した。精製したATFHI-MLを20% SDS-PAGEで調べたところ、計算から求められる23.1kDaの分子量と一致した大きさに、単一バンドとして確認された。また、泳動ゲル内の蛋白質をウェスタンブロット法によりメンブレンに転写し、HI-8に対する抗血清との反応性を調べたところ、この23.1kDaの蛋白質バンドが強く反応することが確認された。

実施例6 プラスミン阻害実験

96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに、PBSを140 μ l、6.25 μ Mのプラスミン水溶液を20 μ lおよび0~10 μ Mのサンプルを20 μ lずつこの順に加えた。23°Cで5分間保温した後、合成基質S-2251溶液(1mg/ml)を20 μ l加え反応を開始した。30分後、20%酢酸を20 μ l加えて反応を止め、405nmでの吸光度を測定し、インヒビターを添加していない時の吸光度に対する相対比をグラフ化した(図16)。その結果、キメラ蛋白質はUTIやHI-8よりも弱い(IC₅₀で2分の1~3分の1)が、同様のプラスミン阻害活性を示し、HI-8の特性を保持していることを確認した。

実施例7 uPAR 結合阻害実験

ヒト組織球性リンパ腫株U937を用いて、uPAがレセプター(uPAR)に結合することをキメラ蛋白質が阻害する実験を行った。まず、リガンドであるフルオレセインイソチオシアネー

ト(fluorescein isothiocyanate: FITC)標識uPAを次のようにして調製した。10mgのuPAを2mlの0.1M NaHCO₃(pH9.0)に溶かし、1mgのFITCを1mlのジメチルスルフォオキシド(DMSO)に溶かした溶液を加え混合した。室温で3時間混合攪拌した後、
5 脱塩用ゲル濾過カラム(PD-10, Pharmacia)に添加し、FITC標識uPAを精製した。ホルボール-12-ミリスタート-13-アセテート(phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA, Sigma)で刺激したU937細胞を集め、50mM glycine-HCl, 0.5M NaCl(pH3.0)で酸処理後、0.5M HEPESバッファー, 0.1M NaCl (pH7.5)で中和し
10 た。この処理により、uPAR結合した内因性のuPAを除去することができる。1×10⁶cells/ml(0.1% BSA, PBS)に調整したU937細胞500μlに、0~1000nM のサンプルを100μl、1mg/mlのFITC標識uPAを2μlおよび0.1% BSAを含むPBS 398μlを加え、4℃で30分間放置した。EPICS PROFILE フローサイトメトリー
15 を用いて、細胞に結合したFITC標識uPAの量を測定した。その結果、キメラ蛋白質ATFHIは、非標識uPAと同等の標識uPAの結合阻害効果を持つことを確認した(図17)。この結果から、このキメラ蛋白質がuPAのGドメインの機能を、保持していることを確認することができた。

20 実施例 8 in vitro 癌細胞浸潤抑制実験

浸潤抑制実験には、ヒト卵巣癌細胞株HOC-I、ヒト絨毛癌細胞株SMT-ccl、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-435、ヒト悪性黒色腫株

A375、ヒト前立腺癌細胞株PC-3、DU-145、ヒト結腸癌細胞株GEOおよびマウスルイス肺腫瘍細胞株3LLの培養細胞を使用した。

ポリカーボネイトフィルター(8 μ m pore size) 付きカップ
5 (Transwell, COSTAR)に、PBSで20倍に希釈したマトリゲル(Matrigel)を100 μ l加え、乾燥させてフィルター表面をコートした。ボイデンチャンバー(modified Boyden chamber)の下層に、600 μ lのRPMI 1640, 0.1% BSA を入れ、チャンバー上層部(フィルター付きカップ)には、無血清培地で様々な濃度
10 に調整したサンプルを100 μ l添加した。23°Cで1時間保温した後、チャンバー上層部に癌細胞懸濁液(2×10^6 cells/ml)を100 μ l加え、チャンバー下層部には、フィブロblast 訓化培地(fibroblast conditioned-media)を走化物質として添加した。5% CO₂インキュベーターに移し、37°Cで12時間培養後、
15 フィルター上部に残った細胞を拭き取り、フィルターを染色した。フィルター下部へ浸潤した細胞数を、顕微鏡下で計測し、浸潤する細胞数が半分となるサンプル濃度(ID₅₀)を求めた(表1)。実験は同じ条件のものを、独立してそれぞれ3回
20 行った。またヨード標識したuPAを用いて、Scatchard plotによる計算から、各培養細胞に発現しているuPAR量を測定した。

この結果、キメラ蛋白質は、マウス由来の癌細胞である3L

LではUTIやHI-8と同程度の効果であるが、ヒト癌細胞ではUTIやHI-8よりも強い浸潤抑制効果を示し、ヒトuPARに特異的に結合することが確認された。また、ATFとHI-8を化学架橋化剤〔N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate〕で結合
5 させた架橋化合物（表1のATF+HI-8 conjugate）（32）よりも、効果があることが確かめられた。キメラ蛋白質の抑制効果は、各細胞に発現しているuPAR量に比例しており、細胞当たりのuPAR発現量が多いSMT-cclやDU-145のような細胞では、より高い抑制効果を示した。

10

15

20

表 1

各種培養細胞に対する浸潤抑制効果 ID₅₀(nM)

細胞名	ATF+HI-8				uPAR			
	UTI	HI-8	ATF	conjugate	ATFHI	ATFHI-CL	ATFHI-ML	site/cell
HOC-I	200	180	1000	70	10	20	50	76000
SMT-cc1	100	220	500	10	1.2	1	10	108000
A375	80	100	1000	80	50	100	120	12000
MDA-MB-435	70	110	800	30	3.5	20	5.6	87000
GEO	300	200	>1000	150	110	200	20	5000
PC-3	50	50	>1000	20	20	20	50	20000
DU-145	260	150	300	30	0.5	5	2.9	96000
3LL	250	200	>1000	200	300	300	200	N. D.

実施例 9 ノードマウスによるヒト癌細胞転移抑制実験

ノードマウス(Balb/c nu/nu, Charles River Japan)は滅菌した飼料と水を与え、無菌的施設で飼育した。1×10⁷個の前立腺癌PC-3細胞を0.2mlのダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM)に懸濁し、5週令の雄マウスに皮下(s.c.)移植した。移植した日から数えて0, 7, 14日目に、50 μgのATFHIまたは生理食塩水をそれぞれ皮下注射により投与した。腫瘍移植後6週目に、皮下にできた腫瘍を手術で取り除き、リンパ節へ転移した転移巣を観察した。この実験では表2に示すように、腫瘍を接種したマウスの約半分にリンパ節転移(16/31)が見られたが、ATFHIは有意に(3

/20)この転移を抑制した。

表 2

サンプル	細胞	接種方法	細胞数	転移した個体数
生理食塩水	PC3	s. c.	1×10^7	16/31
5 ATFHI	PC3	s. c.	1×10^7	3/20

実施例 10 in vitro 細胞毒性

uPAR発現細胞に対するATFHIの細胞毒性について、培養細胞の増殖阻害を見ることにより調べた。 2×10^4 個の培養細胞
 10 (HOC-I, SMT-ccl, PC-3, 3LL)を96穴プレートで一晩培養した後、種々の濃度のATFHIやATFまたはHI-8を含んだロイシン(-)の培地に変えた。その後37℃で20時間培養し、 $1 \mu\text{Ci}$ の
 [^3H]ロイシンを加え、さらに6時間培養した。細胞を集めて凍結融解で破壊し、蛋白質合成により取り込まれた放射性ロ
 15 イシンを測定した(Betaplate scintillation counter, Pharmacia)。その結果、ATFHIは $20 \mu\text{g/ml}$ (約 $1 \mu\text{M}$)の濃度でも細胞を殺すことなく、蛋白質合成に対しても影響を与えなかった。

実施例 11 in vitro 細胞生育活性化

24穴プレートを用い、各ウェルに1000個の癌細胞(HOC-I,
 20 SMT-ccl, PC-3, 3LL)を含む1mlの細胞溶液を入れ培養した。24時間後、0.2%ヒト血清アルブミンを含むPBSで希釈した各種濃度のATFHIを添加した。その後7日間培養後、細胞を染色し

顕微鏡下で細胞を観察した。この結果、このキメラ蛋白質は癌細胞の生育を活性化しないことが確認された。

参考文献(1)～(44)を以下に示す。

- (1) 越川直彦, 宮崎香: 実験医学, 12: 8, 71-76, 1994
- 5 (2) 中島元夫: 実験医学, 12: 8, 77-85, 1994
- (3) Unkeless, J., Dano, K., Kellerman, G.M. and Reich, E.: J. Biol. Chem., 249: 4295-4305, 1974
- (4) Hasui, Y., Suzumiya, J., Marutsuka, K., Sumiyoshi, A., Hashida, S. and Ishikawa, E.: Cancer Res., 49:
10 1067-1070, 1989
- (5) Mignatti, P., Robbins, E. and Rifkin, D.B.: Cell, 47: 487-498, 1986
- (6) Appella, E., Robinson, E.A., Ullrich, S.J., Stoppani, M.P., Corti, A., Cassanni, G. and Blasi, F.: J.
15 Biol. Chem., 262: 4437-4440, 1987
- (7) Ossowski, L.: Cancer Res., 52: 6754-6760, 1992
- (8) Bruckner, A., Filderman, A.E., Kirchheimer, J.C., Binder, B.R. and Remold, H.G.: Cancer Res., 52: 3043-3047, 1992
- 20 (9) Pyke, C., Graem, N., Ralfkiaer, E., Ronne, E., Hoyer-Hansen, G., Brunner, N. and Dano, K.: Cancer Res., 53: 1911-1915, 1993

- (10) Stahl, A. and Mueller, B.M.: Cancer Res., 54: 30
66-3071, 1994
- (11) Behrendt, N., Ronne, E. and Dano, K.: Biol. Chem.
Hoppe-Seyler, 376: 269-279, 1995
- 5 (12) Estreicher, A., Muhlhauser, J., Carpentier, J.-L.,
Orci, L. and Vassalli, J.-D.: J. Cell Biol., 111: 783
-792, 1990
- (13) Blasi, F. and Verde, P.: Seminars in Cancer Biol
ogy, 1: 117-126, 1990
- 10 (14) Mackay, A.R., Corbitt, R.H., Hartzler, J.L. and
Thorgeirsson, U.P.: Cancer Res., 50: 5997-6001, 1990
- (15) 中島元夫: 実験医学, 10: 4, 37-43, 1992
- (16) 佐藤靖史: 実験医学, 13: 2, 25-28, 1995
- (17) Falcone, D.J., McCaffrey, T.A., Haimovitz-Fried
15 man, A. and Garcia, M.: J. Cell. Physiol., 155: 595-60
5, 1993
- (18) Kobayashi, H., Gotoh, J., Shinohara, H., Moniwa,
N. and Terao, T.: Thrombosis and Haemostasis, 71: 4,
474-480, 1994
- 20 (19) Laug, W.E., Cao, X.R., Yu, Y.B., Shimada, H. and
Kruithof, E.K.O.: Cancer Res., 53: 6051-6057, 1993
- (21) Mohanam, S., Sawaya, R., McCutcheon, I., Ali-Osm

an, F., Boyd, D. and Rao, J.S.: Cancer Res., 53: 4143-4147, 1993

(22) Kobayashi, H., Ohi, H., Shinohara, H., Sugimura, M., Fujii, T., Terao, T., Schmitt, M., Goretzki, L.,
5 Chucholowski, N., Janicke, F. and Graeff, H.: Br. J. Cancer, 67: 537-544, 1993

(23) Kobayashi, H., Gotoh, J., Fujie, M., Shinohara, H., Moniwa, N. and Terao, T.: Int. J. Cancer, 57: 727-733, 1994

10 (24) Crowley, C.W., Cohen, R.L., Lucas, B.K., Liu, G., Shuman, M.A. and Levinson, A.D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5021-5025, 1993

(25) Lu, H., Yeh, P., Guitton, J.-D., Mabilat, C., Desanlis, F., Maury, I., Legrand, Y., Soria, J. and Soria C.:
15 FEBS Letters, 356: 56-59, 1994

(26) 英国特許No.2246779B

(27) Kobayashi, H., Fujie, M., Shinohara, H., Ohi, H., Sugimura, M. and Terao, T.: Int. J. Cancer, 57: 378-384, 1994

20 (28) Kobayashi, H., Shinohara, H., Ohi, H., Sugimura, M., Terao, T. and Fujie, M.: Clin. Exp. Metastasis, 12: 117-128, 1994

- (29) Kobayashi, H., Shinohara, H., Takeuchi, K., Itoh, M., Fujie, M., Saitoh, M. and Terao, T.: Cancer Res., 54: 844-849, 1994
- (30) Wachter, E. and Hochstrasser, K.: Hoppe-Seyler's
5 Z. Physiol. Chem., 362: 1351-1355, 1981
- (31) Kobayashi, H., Gotoh, J., Kanayama, N., Hirashim
a, Y., Terao, T. and Sugino, D.: Cancer Res., 55: 1847
-1852, 1995
- (32) Kobayashi, H., Gotoh, J., Hirashima, Y., Fujie,
10 M., Sugino, D. and Terao, T.: J. Biol. Chem., 270: 836
1-8366, 1995
- (33) Ohnishi, H., Kosuzume, H., Ashida, Y., Kato, K.
and Honjo, I.: Dig. Dis. Sci., 29: 26-32, 1984
- (34) Ohnishi, H., Suzuki, K., Niho, T., Ito, C. and Y
15 amaguchi, K.: Jpn. J. Pharmacol., 39: 137-144, 1985
- (35) 橋本 正勝, 他: 医学と薬学, 13: 1091-1096, 1985
- (36) 小雀 浩司, 他: 医学のあゆみ, 125: 187-190, 1983
- (37) 網沢 進: 蛋白質核酸酵素, 40: 389-398, 1995
- (38) Hibino, Y., Miyake, T., Kobayashi, Y., Ohmori, M.,
20 Miki, T., Matsumoto, R., Numao, N. and Kondo, K.: Agr
ic. Biol. Chem., 52: 329-336, 1988
- (39) 米国特許No. 5112755

(40) 特公平5-52189

(41) 特開平5-30970

(42) 特開平5-91877

(43) 特開平5-336965

- 5 (44) Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O. and Kotick, M.P.:
Nucl. Acids Res., 14: 7839-7850, 1986

10

15

20

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 6 2 4

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATCCAATCA A ATG AGT AAT GAA CTA CAT CAA GTA CCA TCG AAC TGT GAC	50
Met Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp	
-1 1 5 10	
TGT CTA AAT GGA GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT	98
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile	
15 20 25	
CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA	146
His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile	
30 35 40	
GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA	194
Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly	
45 50 55 60	
AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT	242
Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser	
65 70 75	
GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT	290
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu	
80 85 90	

CAG CTG GGC CTG GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG 338
 Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
 95 100 105
 AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA 386
 Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
 110 115 120
 GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGT ACC GTT GCT GCT TGC AAC 434
 Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala Cys Asn
 125 130 135 140
 CTG CCG ATT GTC CGT GGT CCG TGC CGT GCT TTC ATC CAG CTG TGG GCT 482
 Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala
 145 150 155
 TTC GAC GCT GTT AAA GGT AAA TGC GTT CTG TTC CCG TAT GGT GGT TGC 530
 Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys
 160 165 170
 CAG GGT AAC GGT AAC AAA TTC TAT TCT GAA AAA GAA TGC CGT GAA TAT 578
 Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr
 175 180 185
 TGC GGT GTT CCG GGT TGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA 624
 Cys Gly Val Pro Gly
 190 193

配列番号 : 2

配列の長さ : 6 4 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATCCAATCA A ATG AGT AAT GAA CTA CAT CAA GTA CCA TCG AAC TGT GAC	50
Met Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp	
-1 1 5 10	
TGT CTA AAT GGA GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT	98
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile	
15 20 25	
CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA	146
His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile	
30 35 40	
GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA	194
Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly	
45 50 55 60	
AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT	242
Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser	
65 70 75	
GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT	290
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu	
80 85 90	

CAG CTG GGC CTG GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG 338
 Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
 95 100 105
 AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA 386
 Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
 110 115 120
 GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGT ACC GTT GCT GCT TGC AAC 434
 Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala Cys Asn
 125 130 135 140
 CTG CCG ATT GTC CGT GGT CCG TGC CGT GCT TTC ATC CAG CTG TGG GCT 482
 Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala
 145 150 155
 TTC GAC GCT GTT AAA GGT AAA TGC GTT CTG TTC CCG TAT GGT GGT TGC 530
 Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys
 160 165 170
 CAG GGT AAC GGT AAC AAA TTC TAT TCT GAA AAA GAA TGC CGT GAA TAT 578
 Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr
 175 180 185
 TGC GGT GTT CCG GGT GAT GGT GAT GAA GAA CTG CTG TGATCCTCTAGAGTCG 630
 Cys Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu
 190 195 200
 ACCTGCAGGCATGCA 645

配列番号 : 3

配列の長さ : 6 6 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATCCAATCAA	ATG	AGT	AAT	GAA	CTA	CAT	CAA	GTA	CCA	TCG	AAC	TGT	GAC	50
Met	Ser	Asn	Glu	Leu	His	Gln	Val	Pro	Ser	Asn	Cys	Asp		
-1	1					5				10				
TGT	CTA	AAT	GGA	GGA	ACA	TGT	GTG	TCC	AAC	AAG	TAC	TTC	TCC	98
Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Ser	Asn	Lys	Tyr	Phe	Ser	
15						20				25				
CAC	TGG	TGC	AAC	TGC	CCA	AAG	AAA	TTC	GGA	GGG	CAG	CAC	TGT	146
His	Trp	Cys	Asn	Cys	Pro	Lys	Lys	Phe	Gly	Gly	Gln	His	Cys	
30						35				40				
GAT	AAG	TCA	AAA	ACC	TGC	TAT	GAG	GGG	AAT	GGT	CAC	TTT	TAC	194
Asp	Lys	Ser	Lys	Thr	Cys	Tyr	Glu	Gly	Asn	Gly	His	Phe	Tyr	
45					50				55			60		
AAG	GCC	AGC	ACT	GAC	ACC	ATG	GGC	CGG	CCC	TGC	CTG	CCC	TGG	242
Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Thr	Met	Gly	Arg	Pro	Cys	Leu	Pro	Trp	
					65				70			75		
GCC	ACT	GTC	CTT	CAG	CAA	ACG	TAC	CAT	GCC	CAC	AGA	TCT	GAT	290
Ala	Thr	Val	Leu	Gln	Gln	Thr	Tyr	His	Ala	His	Arg	Ser	Asp	
					80				85			90		

CAG CTG GGC CTG GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG 338
 Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
 95 100 105
 AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA 386
 Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
 110 115 120
 GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA AAG CCC TCC TCT CCT 434
 Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro
 125 130 135 140
 CCA GAA GAA TTA AAA TTT CAG GGT ACC GTT GCT GCT TGC AAC CTG CCG 482
 Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro
 145 150 155
 ATT GTC CGT GGT CCG TGC CGT GCT TTC ATC CAG CTG TGG GCT TTC GAC 530
 Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala Phe Asp
 160 165 170
 GCT GTT AAA GGT AAA TGC GTT CTG TTC CCG TAT GGT GGT TGC CAG GGT 578
 Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly
 175 180 185
 AAC GGT AAC AAA TTC TAT TCT GAA AAA GAA TGC CGT GAA TAT TGC GGT 626
 Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly
 190 195 200
 GTT CCG GGT TGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA 666
 Val Pro Gly
 205 207

配列番号 : 4

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列 :

CGTGAGCGAC TCCAAAGGCA GCAATG

26

10 配列番号 : 5

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列 :

AAACCAGGGC TGGTTCTCGA TGGTGGTG

28

配列番号 : 6

20 配列の長さ : 64

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

CAIGAAAAAA ACCGCTATCG CTATCGCTGT TGCTCTGGCT GGTTTTGCTA CCGTTGCTCA 60
GGCC 64

5

配列番号：7

配列の長さ：60

配列の型：核酸

10 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGCCTGAGCA ACGGTAGCAA AACCAGCCAG AGCAACAGCG ATAGCGATAG CGGTTTTTTTT 60

15

配列番号：8

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列：

GGGTACCATC TGCGCAGTCA TGCAC 25

配列番号 : 9

配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATCCAATCA AATGAGTAAT GAACTACATC AAGTACCAT

39

10 配列番号 : 10

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列 :

CGATGGTACT TGATGTAGTT CATTACTCAT TTGATTG

37

配列番号 : 11

20 配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGGTACCGTT GCTGCTTGCA ACCTGCCGAT TGTCCG

36

5

配列番号：1 2

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列：

GTGATCAACC CGGAACACCG CAATATTAC GG

32

15 配列番号：1 3

配列の長さ：5 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

20 配列：

GTGAATATTG CCGTGTTCCG GGTGATGGTG ATGAAGAACT GCTGTGATCC T

51

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列 :

CTAGAGGATC ACAGCAGTTC TTCATCACCA TCACCCGGAA CACCGCAATA TTCACGG

57

10 配列番号 : 1 5

配列の長さ : 1 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列 :

AATTTCAGGG TAC

13

配列番号 : 1 6

20 配列の長さ : 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

CCTAG

5

5

配列番号：1 7

配列の長さ：2 5 3

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列：

	GGTTGCTGCT TGCAACCTGC CGGTTATCCG TGGTCCGTGC CGTGCTTTCA TCCAGCTGTG	60
	GGCTTTCGAC GCTGTAAAG GTAAATGCGT TCTGTTCCCG TAATGGTGGTT GCCAGGGTAA	120
	CGGTAACAAA TTCTATTCTG AAAAAGAATG CCGTGAATAT TGCGGTGTTC CGGGTGACGA	180
15	AGACGAAGAA CTGCTGTGAT GATCTAGAGC CCAGCCCGCC TAATGAGCGG GCTTTTTTTT	240
	GAACAAAAGG CGG	253

配列番号：1 8

配列の長さ：2 6 1

20 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

	AATTCCGCCT TTTGTTCAAA AAAAAGCCCG CTCATTAGGC GGGCTGGGCT CTAGATCATC	60
	ACAGCAGTTC TTCGTCITCG TCACCCGGAA CACCGCAATA TTCACGGCAT TCTTTTTCAG	120
	AATAGAATTT GTTACCGTTA CCCTGGCAAC CACCATACGG GAACAGAACG CATTTACCTT	180
5	TAACAGCGTC GAAAGCCAC AGCTGGATGA AAGCACGGCA CGGACCACGG ATAACCGGCA	240
	GGTTGCAAGC AGCAACCGTA C	261

10

15

20

請求の範囲

1. 下記（式1）の配列をN末端側に、下記（式2）の配列をC末端側に含むキメラ蛋白質：

（式1）

5 Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser
Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys

（式2）

Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly
10 Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg
Glu Tyr Cys

2. 前記（式1）と前記（式2）の配列の間に、下記の4種の配列のいずれかを含む介在配列をさらに含む請求項1記載のキメラ蛋白質：

- 15 ・（式3）-Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala
・（式3）-Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu
Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala；
・Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala；及び
・Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala。

20 3. 下記（式A）：

N末端-(配列I)-(式1)-(配列II)-(式2)-(配列III)-C末端
（式A）

〔（式 A）中、（式 1）および（式 2）は前記に同じ。〕

（配列 I）は、水素原子または下記のいずれかのアミノ酸配列を示す：

```

Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
5      Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
      Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
      Leu His Gln Val Pro Ser Asn
      His Gln Val Pro Ser Asn
      Gln Val Pro Ser Asn
10     Val Pro Ser Asn
      Pro Ser Asn
      Ser Asn
      Asn

```

15 （配列 II）は、下記の（式 3）を含むグループおよび含まないグループから選ばれるいずれかの配列を示す：

・（式 3）を含むグループ

```

（式 3）- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala
（式 3）- Ala Asp Gly Val Ala Ala
20 （式 3）- Ala Asp Gly Ala Ala
（式 3）- Ala Asp Gly Xaa
（式 3）- Ala Asp Thr Val Ala Ala

```

- (式3)- Ala Asp Val Ala Ala
- (式3)- Ala Asp Ala Ala
- (式3)- Ala Asp Xaa
- (式3)- Ala Thr Val Ala Ala
- 5 (式3)- Ala Val Ala Ala
- (式3)- Xaa Thr Val Ala Ala
- (式3)- Xaa Val Ala Ala
- (式3)- Xaa Ala Ala
- (式3)- Xaa Xaa
- 10 (式3)- Val Ala Ala
- (式3)- Xaa
- (式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu
Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala
- ・(式3)を含まないグループ
- 15 Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Xaa
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Xaa
- 20 Glu Ile Asp Lys Ser Lys Val Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Lys Ala Ala
- Glu Ile Asp Lys Ser Thr Val Ala Ala

Glu Ile Asp Lys Ser Val Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Ser Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Ser Xaa
Glu Ile Asp Lys Thr Val Ala Ala
5 Glu Ile Asp Lys Val Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Ala Ala
Glu Ile Asp Lys Xaa
Glu Ile Asp Thr Val Ala Ala
Glu Ile Asp Val Ala Ala
10 Glu Ile Asp Ala Ala
Glu Ile Asp Xaa
Glu Ile Thr Val Ala Ala
Glu Ile Val Ala Ala
Glu Ile Ala Ala
15 Glu Ile Xaa
Glu Thr Val Ala Ala
Glu Val Ala Ala
Glu Ala Ala
Glu Xaa
20 Xaa

(ただし、Xaaは、蛋白質を構成する任意のアミノ酸を示し、
式3はuPAの43～131に相当する以下の配列を示す。

(式 3)

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr
 Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp
 Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp
 5 Ala Leu Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
 Asn Arg Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu
 Val Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys

(配列III)は、水酸基(—OH)または下記のいずれかのアミノ酸配列を示す：

10 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu
 Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp
 15 Gly Val Pro Gly Asp Gly
 Gly Val Pro Gly Asp
 Gly Val Pro Gly
 Gly Val Pro
 Gly Val
 20 Gly

]

で表される配列を有する請求項1に記載のキメラ蛋白質。

4. 配列IIが、(式3)を含むグループから選ばれる場合：

(式3)- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

又は

(式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

5 Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala

であり、(式3)を含まないグループから選ばれる場合：

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala、

又は

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala

10 である請求項3記載のキメラ蛋白質

5. 配列IがSer Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn
で表される請求項3記載のキメラ蛋白質。

6. 配列IがSer Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asnで
表され、かつ、

15 配列IIが(式3)を含むグループから選ばれる場合：

(式3)- Ala Asp Gly Thr Val Ala Ala

又は

(式3)- Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu

Glu Leu Lys Phe Gln Gly Thr Val Ala Ala

20 であり、(式3)を含まないグループから選ばれる場合：

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Thr Val Ala Ala、

又は

Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Val Ala Ala

である請求項 3 記載のキメラ蛋白質。

7. 下記（式 1）の配列をコードする DNA 配列を 5' 側に、下記（式 2）の配列をコードする DNA 配列を 3' 側に含むキメラ蛋白質をコードする DNA :

（式 1）

Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser
Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys

（式 2）

- 10 Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly
Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg
Glu Tyr Cys

8. 下記（式 A） :

- 15 N末端-(配列 I)-(式 1)-(配列 II)-(式 2)-(配列 III)-C末端
（式 A）

〔（式 A）中、（配列 I）、（式 1）、（配列 II）、（式 2）および（配列 III）は前記に同じ。〕

- で表される配列を有するキメラ蛋白質をコードする請求項 7
20 に記載の DNA。

9. 請求項 7 または 8 に記載の DNA を含むプラスミド。

10. 請求項 9 のプラスミドを宿主細胞に導入してなる形質

転換体。

11. 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のキメラ蛋白質を有効成分とする癌転移抑制剤。
12. 請求項 7 または 8 に記載の DNA を組み込んだプラスミドを宿主細胞に導入して形質転換体とし、該形質転換体を培養し、培養物からキメラ蛋白質を回収することを含むキメラ蛋白質の製造方法。
13. 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のキメラ蛋白質の治療的有効量を癌患者に投与することを含む癌転移予防方法。
- 10 14. 前記形質転換体が FERM BP-5293 である請求項 10 記載の形質転換体。
15. 前記形質転換体が FERM BP-5745 である請求項 10 記載の形質転換体。
16. 前記形質転換体が FERM BP-5746 である請求項 10 記載の形質転換体。
- 15 17. 配列番号 1 の 1 ～ 193 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の蛋白質。
18. 配列番号 2 の 1 ～ 200 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の蛋白質。
- 20 19. 配列番号 3 の 1 ～ 207 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の蛋白質。
20. 配列番号 1 の 15 ～ 593 の核酸配列を含む請求項 7

に記載の D N A。

21. 配列番号 2 の 1 5 ～ 6 1 4 の核酸配列を含む請求項 7
に記載の D N A。

22. 配列番号 3 の 1 5 ～ 6 3 5 の核酸配列を含む請求項 7
5 に記載の D N A。

10

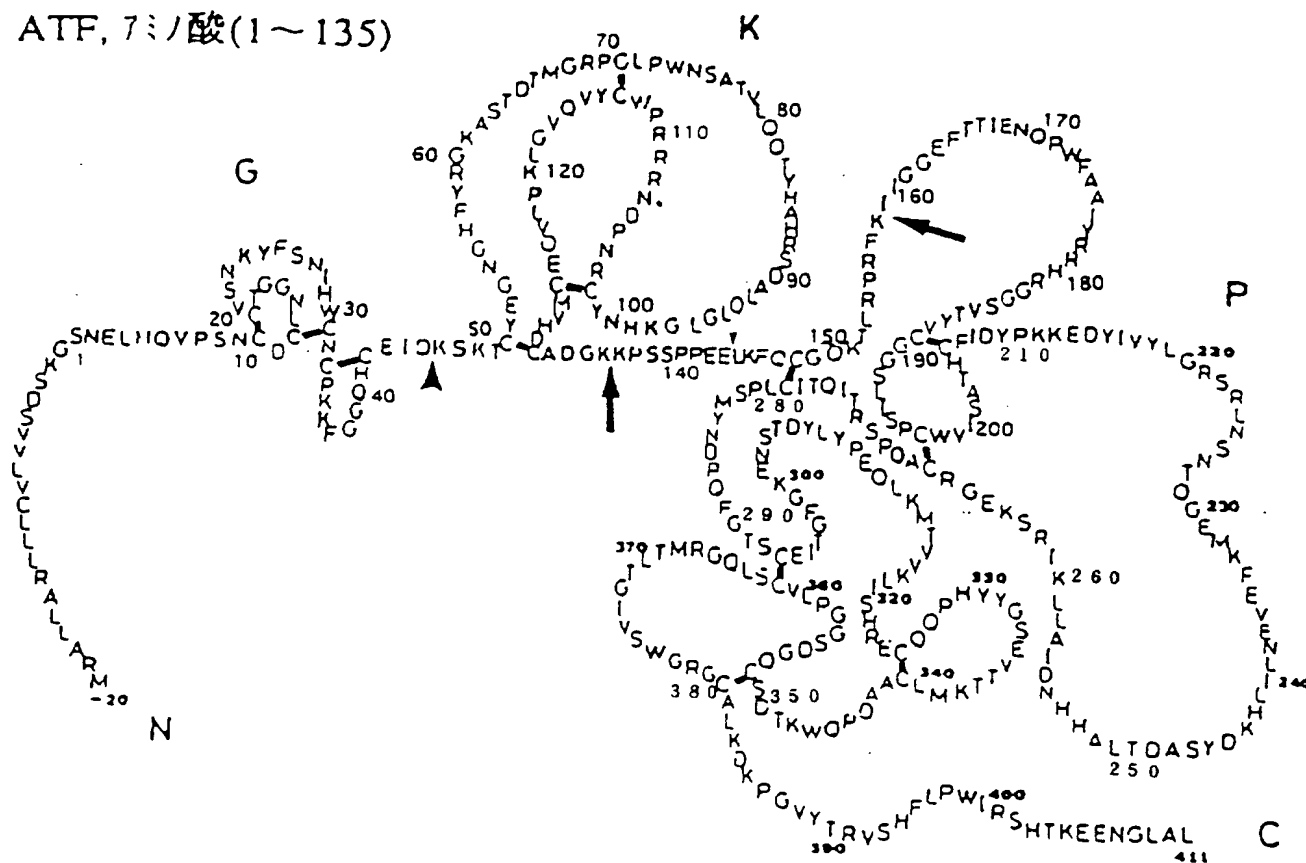
15

20

1/15

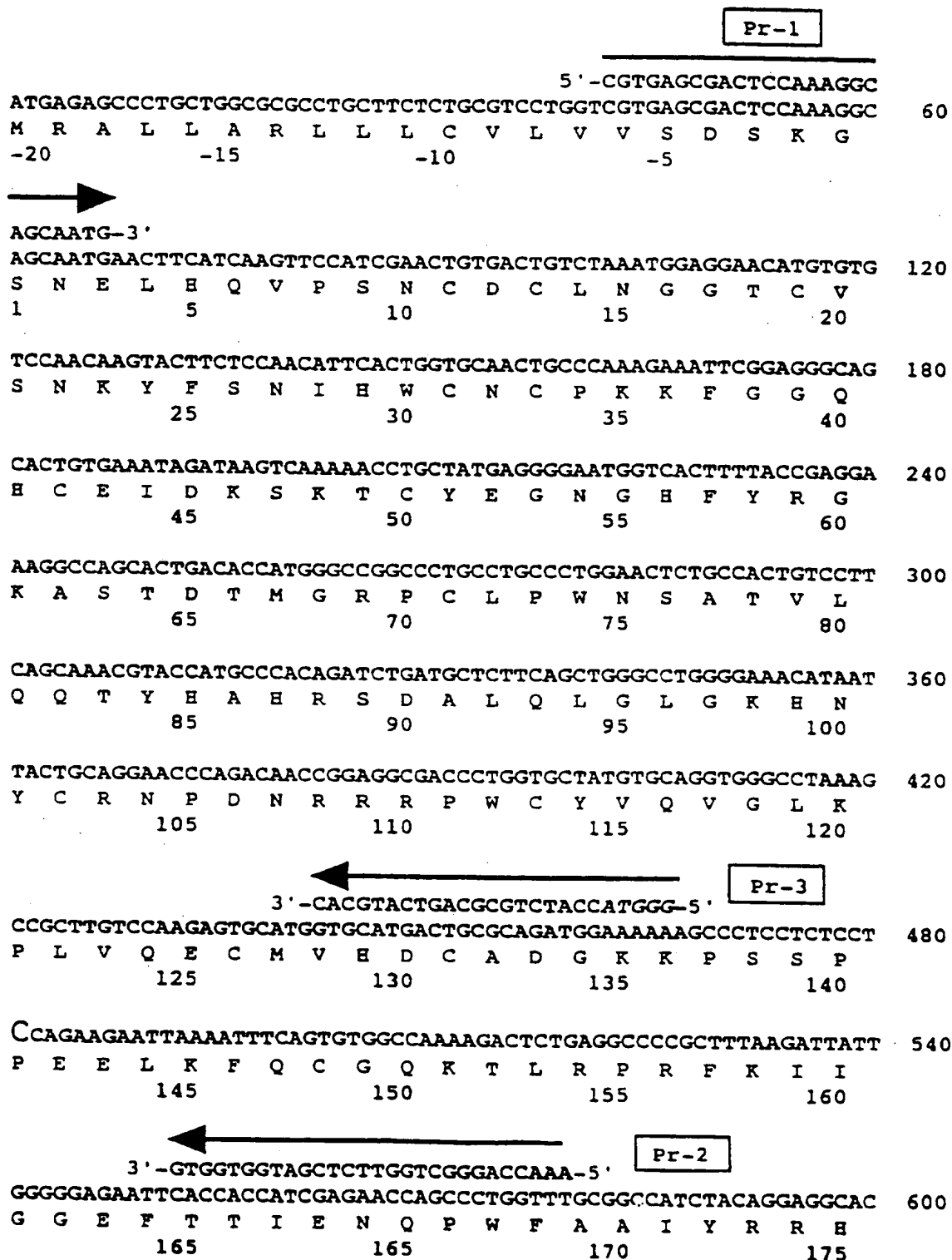
Fig. 1

ATF, 73/100 (1~135)



4/15

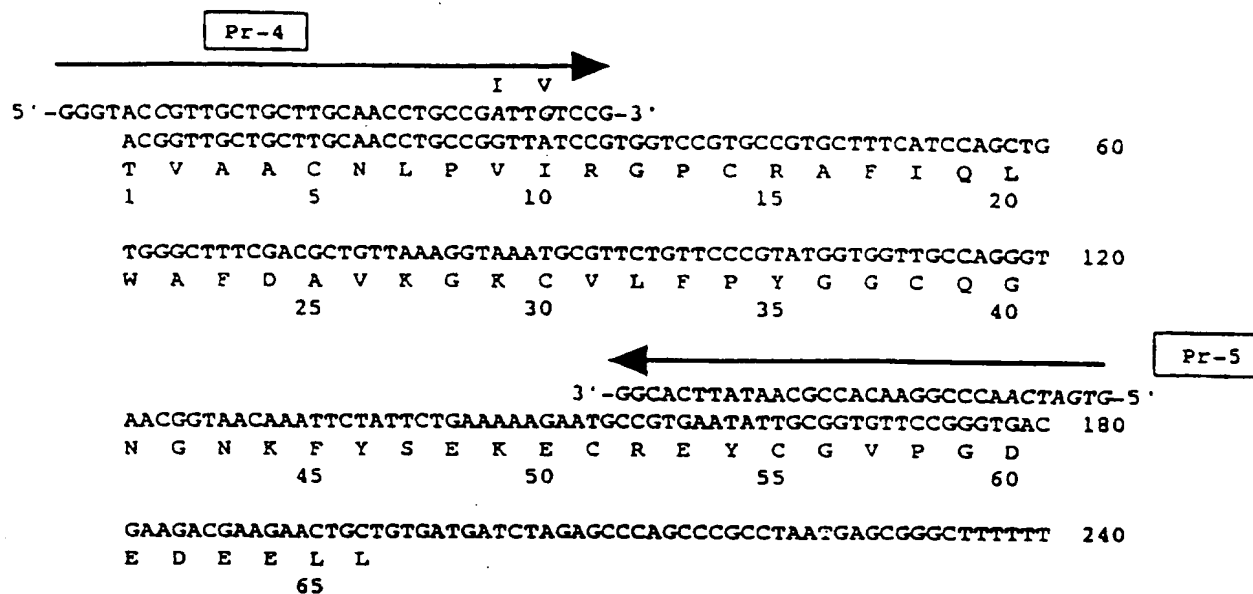
Fig. 5



差替え用紙 (規則26)

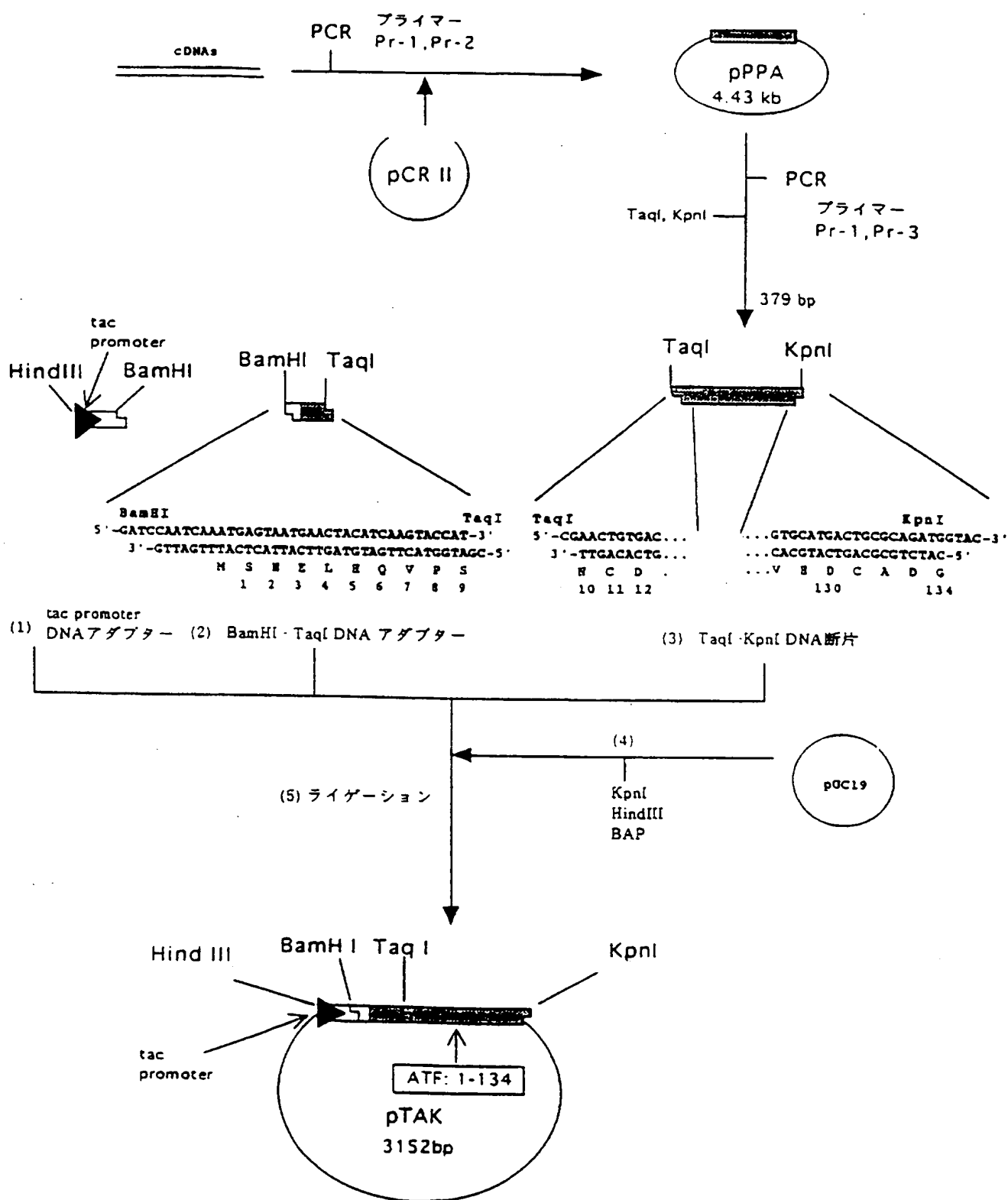
5/15

Fig. 6



6/15

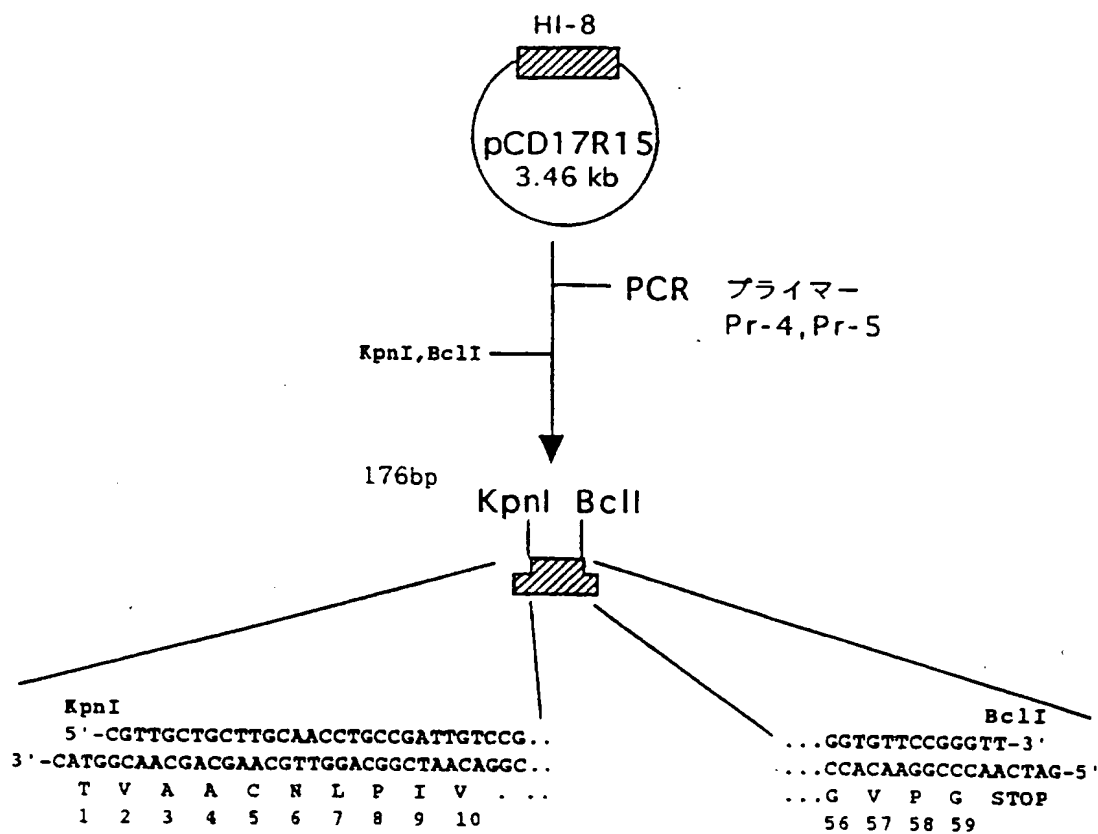
Fig. 7



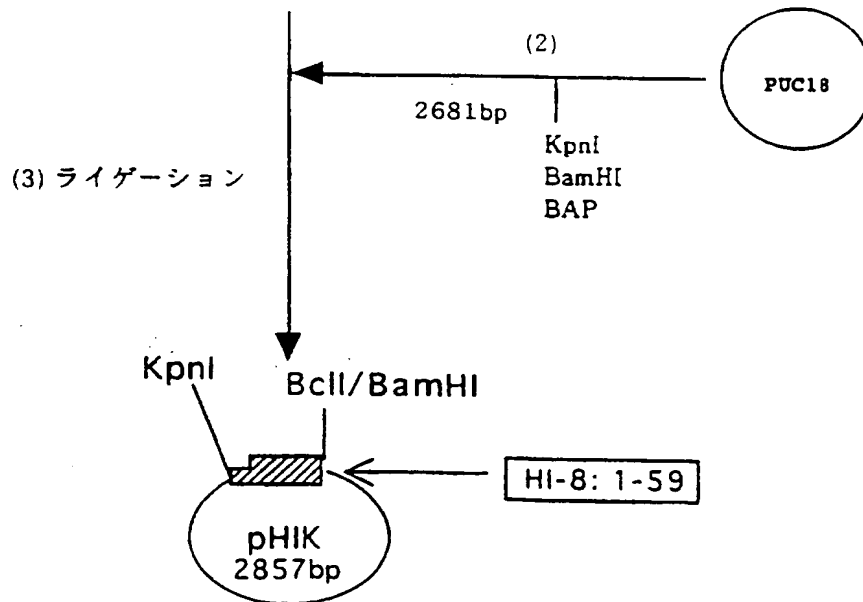
差替え用紙 (規則26)

7/15

Fig. 8



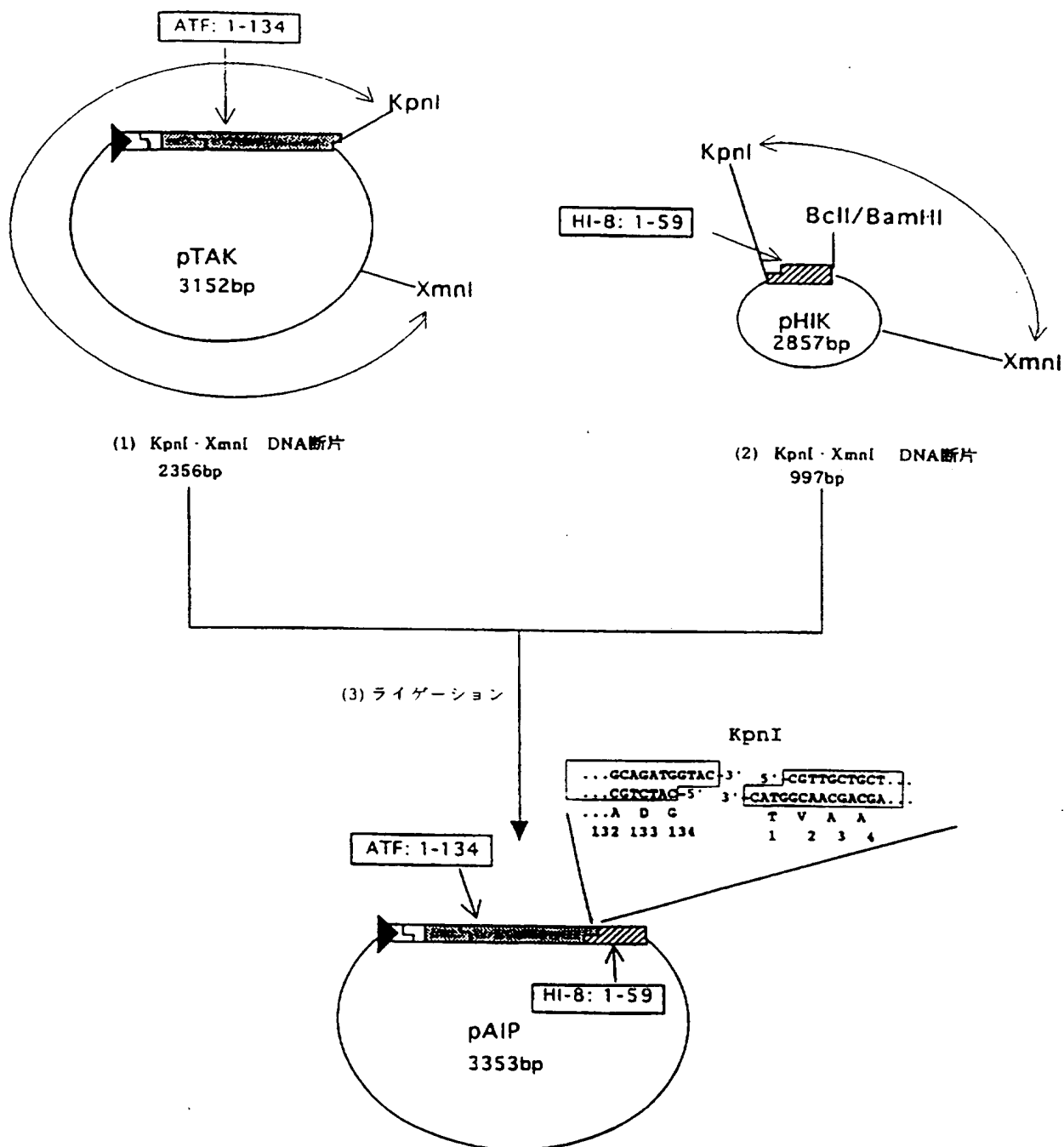
(1) KpnI-BclI DNA断片



替换页(细则第26条)

8/15

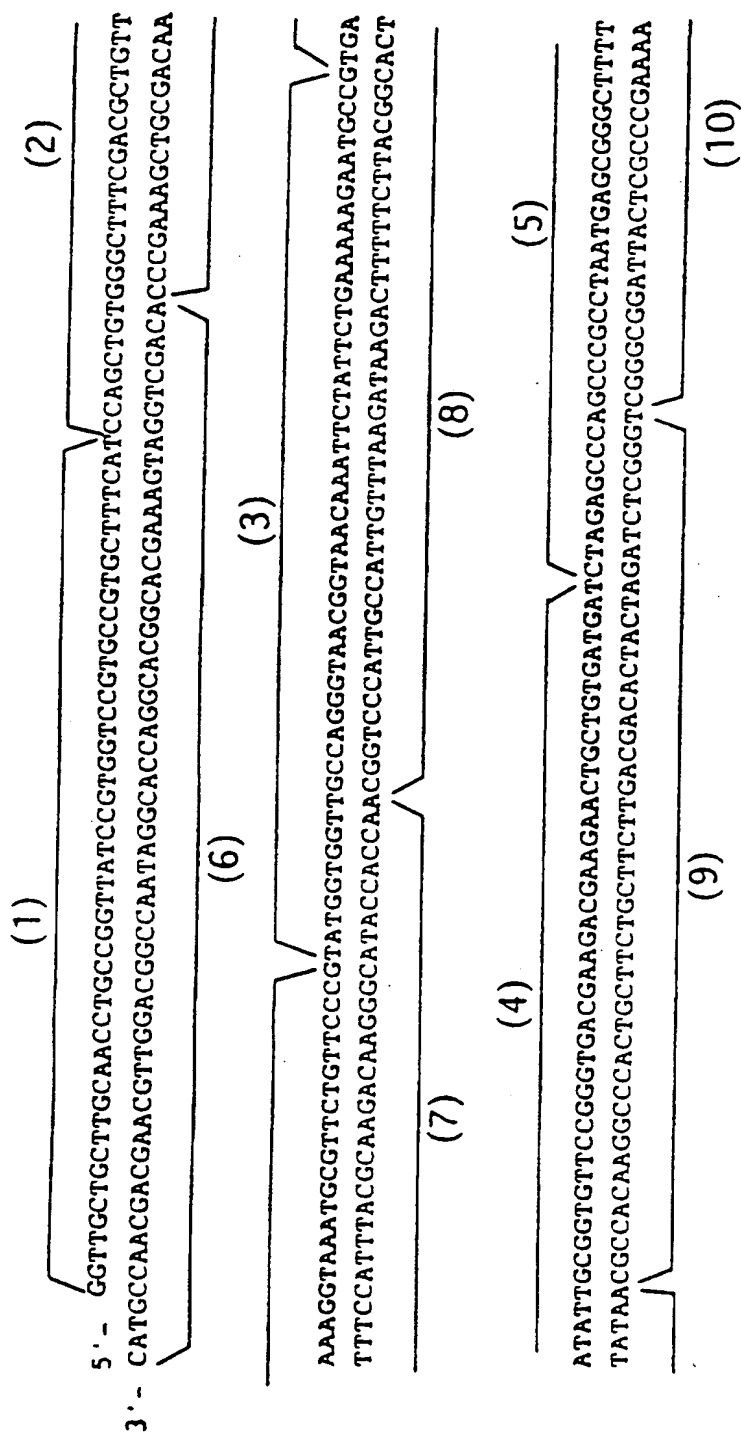
F i g . 9



差替え用紙 (規則26)

9/15

Fig. 10

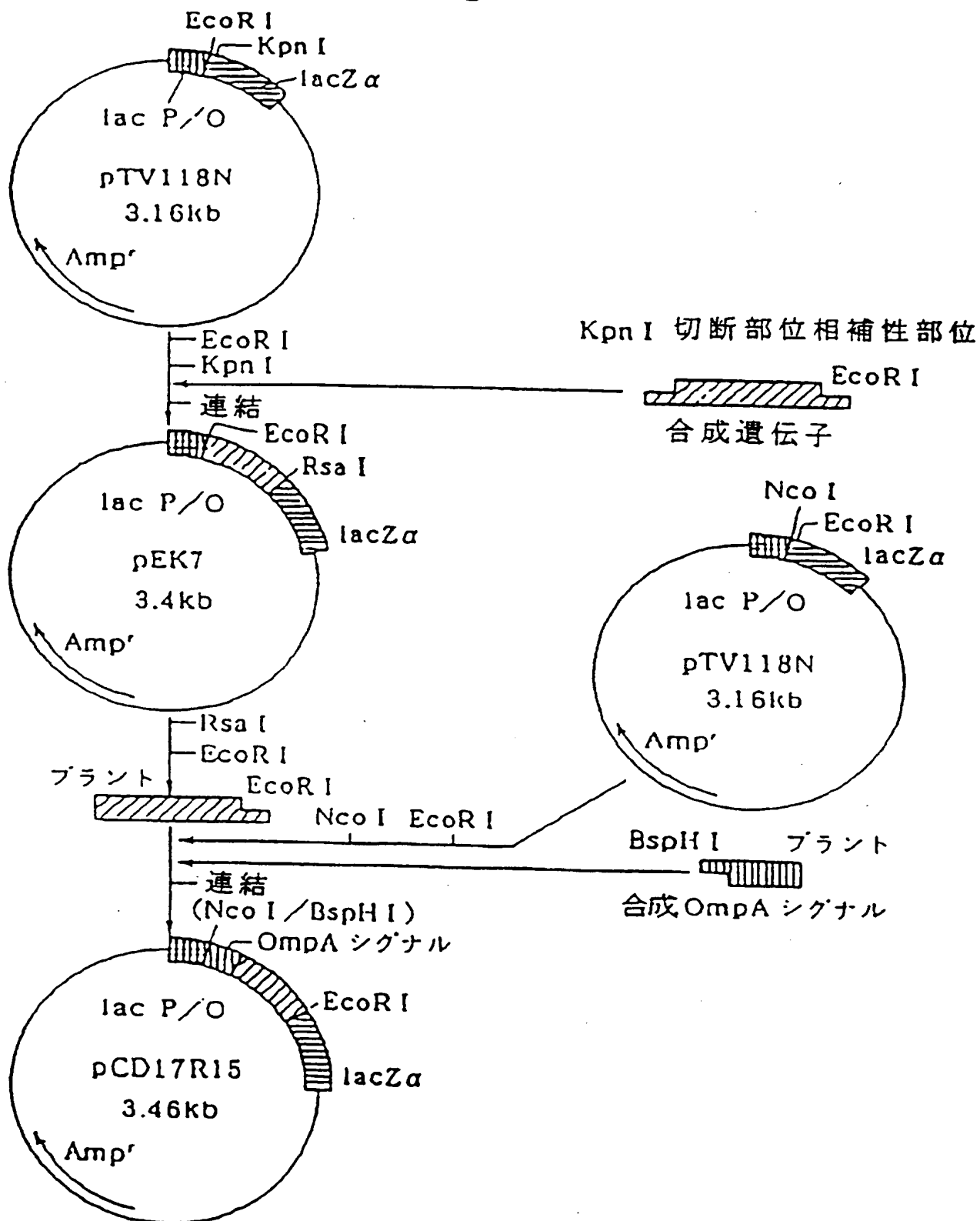


TTTGTGACAAAGCGG -3'
AAACTTGTTTCCGCCCTTA -5'

差替之用紙（規則26）

10/15

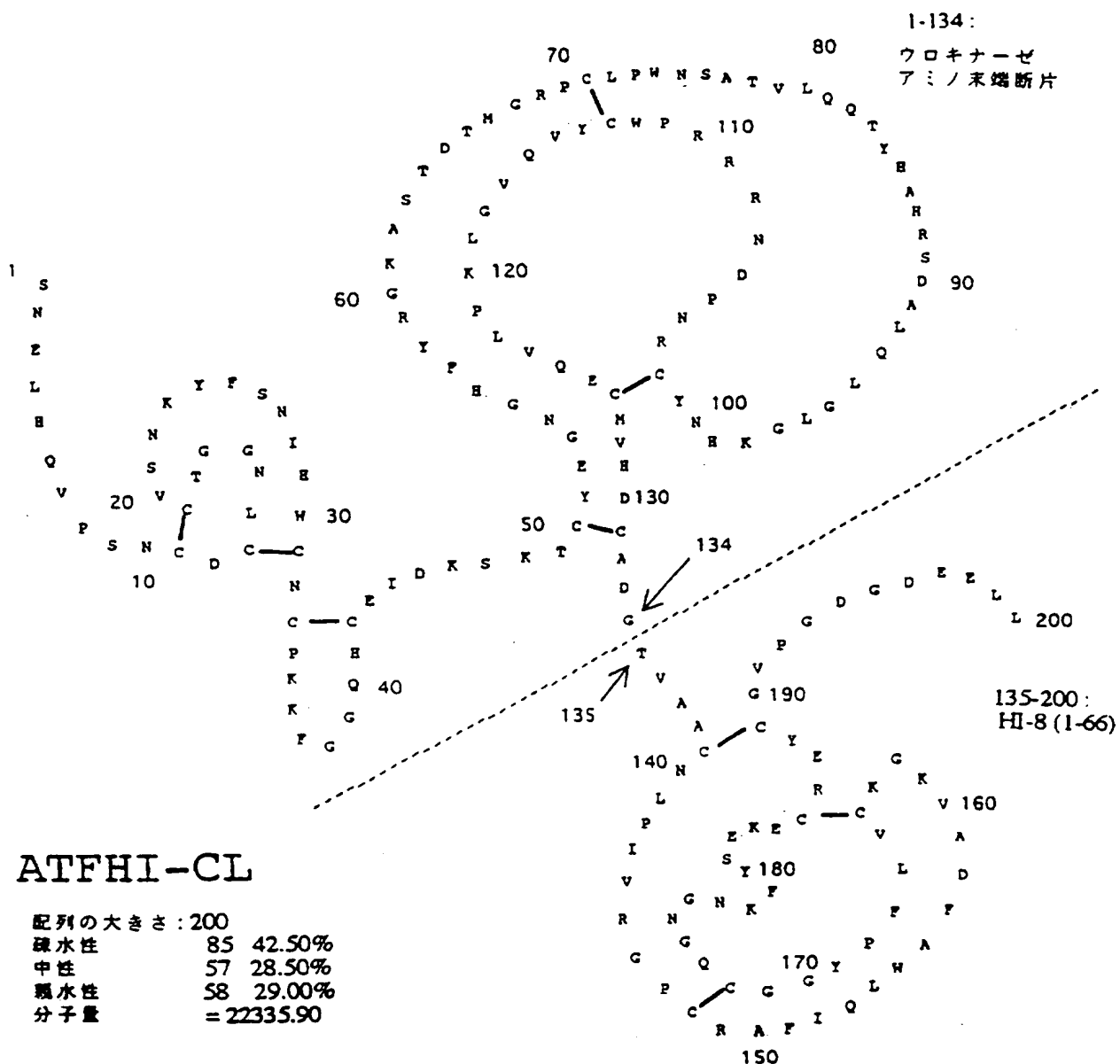
Fig. 11



差替え用紙 (規則26)

11/15

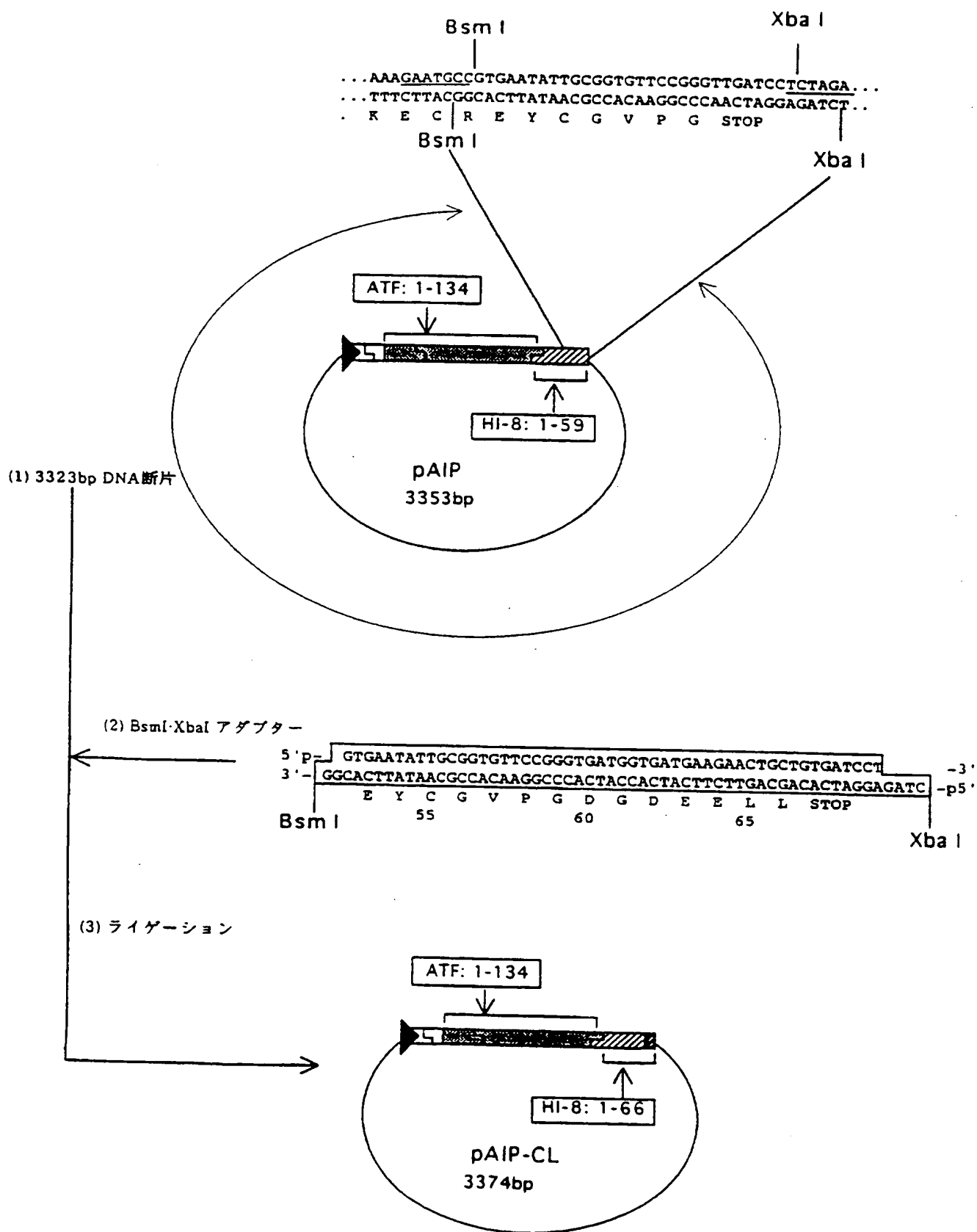
Fig. 12



差替之用紙（規則26）

12/15

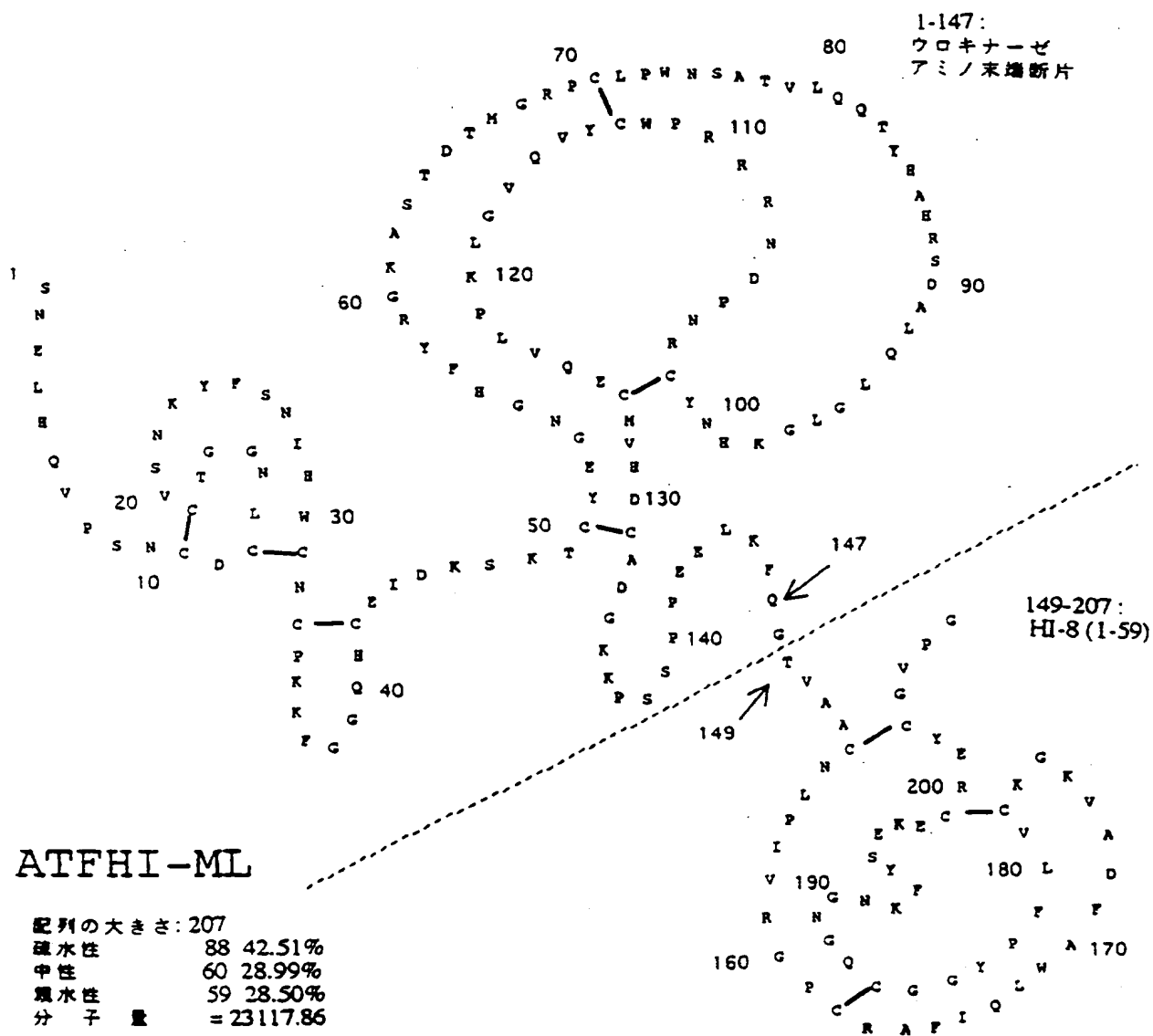
Fig. 13



差替え用紙 (規則26)

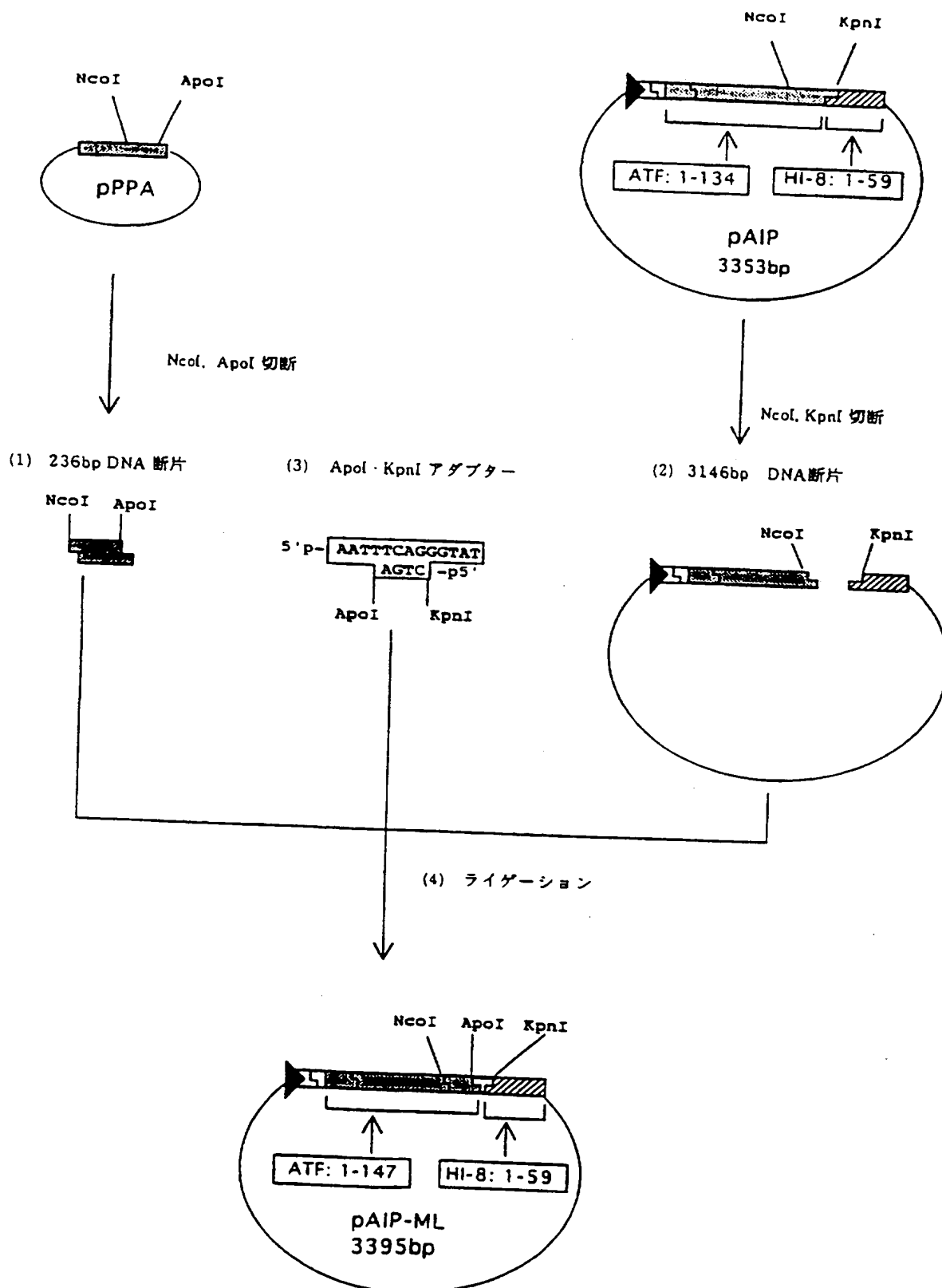
13/15

Fig. 14



14/15

Fig. 15



差替え用紙 (規則26)

15/15

Fig. 16

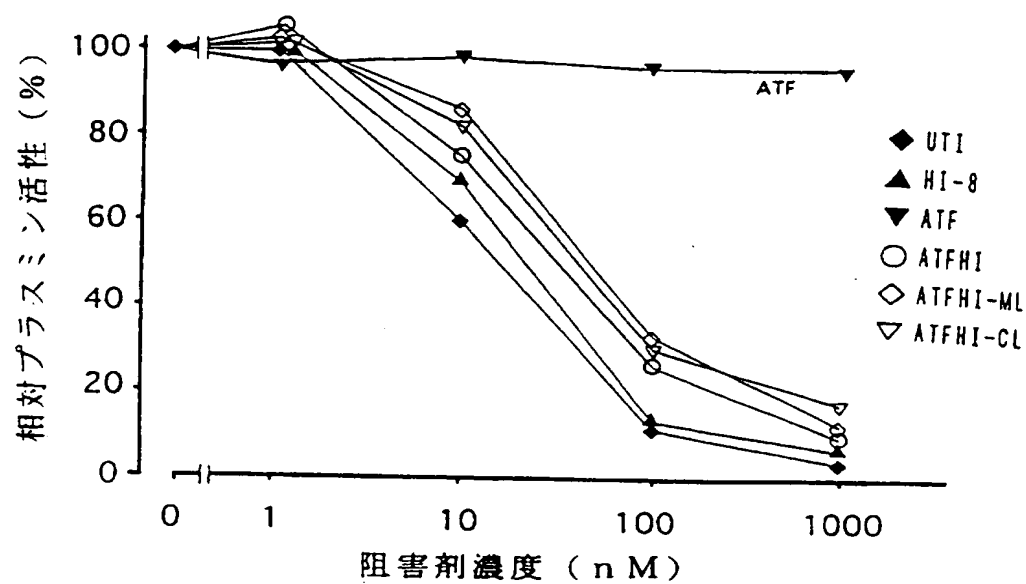
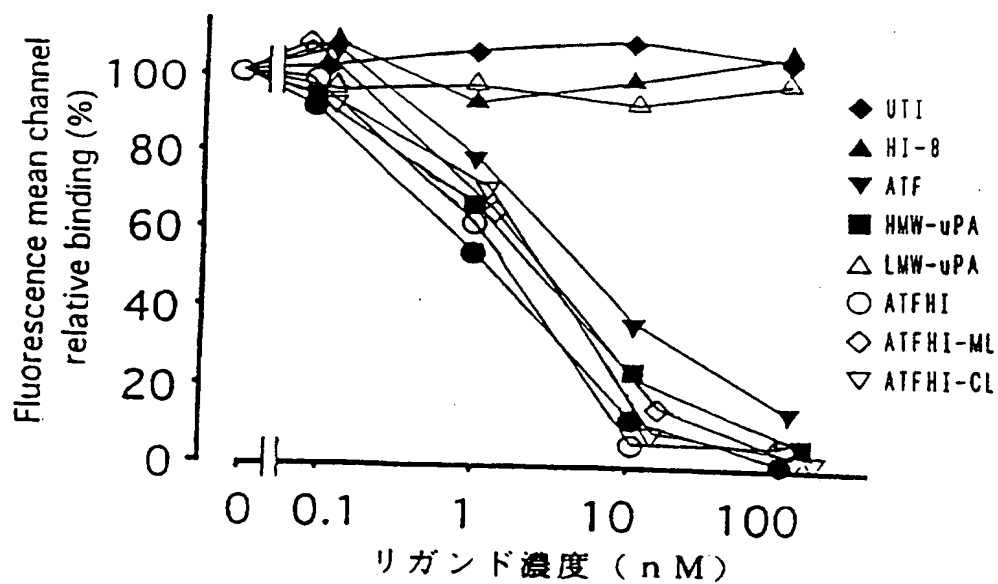


Fig. 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57 //
(C12P21/02, C12R1:19), (C12N21/02, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS, MEDLINE, CAS ONLINE, JICST File on Science
and Technology, GENETYX-MAC/CD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem. 270(14) (1995) Kobayashi H. et al. "Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro" p. 8361-8366	1 - 22
P,X P,A	Acta Obster. Gynaecol. Japan. 48(8) (08. 1996) Kobayashi H. "Mechanism of extracellular matrix disruption by cancer cells and inhibition of infiltration and metastasis by controlling the same" p. 623-632	1 2 - 22
P,X P,A	Biotherapy 10(10) (10. 1996) Shinohara H. et al. "Urinary trypsin inhibitor (UTI) and its application-Inhibition of infiltration and metastasis of cancer by synthetic substnace" p. 1359-1365	1 2 - 22
P,X P,A	Ketsueki-Shuyoka 33(4) (10. 1996) Kobayashi H. "Inhibition of infiltration and metastasis by urokinase-trypsin inhibitor conjugate" p. 324-332	1 2 - 22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
April 11, 1997 (11. 04. 97)Date of mailing of the international search report
April 22, 1997 (22. 04. 97)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	Experimental Medicine, 14(17) (11. 1996) Kobayashi H. "Control of degradation of extracellular matrix mediated by protease in cancer infiltration and metastasis" p. 2487-2493	1 2 - 22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57 //
(C12P21/02, C12R1:19), (C12N21/02, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS, MEDLINE, CAS ONLINE, JICST科学技術文献ファイル, GENETYX-MAC/CD

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem. 270 [14] (1995) Kobayashi H. et al 「Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro」 p. 8361-8366	1-22
P, X P, A	日本産科婦人科学会雑誌 48 [8] (08.1996) 小林 浩 「癌細胞の細胞外マトリックス破壊の機序とその制御による浸潤、転移抑制」 p. 623-632	1 2-22
P, X P, A	Biotherapy 10 [10] (10.1996) 篠原 弘光 他 「Urinary trypsin inhibitor (UTI) とその応用 合成物質による癌の浸潤転移抑制」 p. 1359-1365	1 2-22
P, X P, A	血液・腫瘍科 33 [4] (10.1996) 小林 浩 「ウロキナーゼトリプシンインヒビター複合体による癌浸潤・転移の抑制」 p. 324-332	1 2-22

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.97

国際調査報告の発送日

22.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明昭

印

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	実験医学 14 [17] (11. 1996) 小林 浩 「癌浸潤転移におけるプロテアーゼを介した細胞外マトリックスの分解制御」 p. 2487-2493	1 2-22

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/435, C12P 21/02, C12N 1/21, A61K 38/57 // (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/25422</p> <p>(43) 国際公開日 1997年7月17日(17.07.97)</p>												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00008</p> <p>(22) 国際出願日 1997年1月6日(06.01.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/1059 1996年1月8日(08.01.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日清食品株式会社 (NISSIN FOOD PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒532 大阪府大阪市淀川区西中島四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 小林 浩(KOBAYASHI, Hiroshi)(JP/JP) 〒431-31 静岡県浜松市有玉西町622-5 Shizuoka, (JP) 寺尾俊彦(TERAOKA, Toshihiko)(JP/JP) 〒431-31 静岡県浜松市半田町4872-29 Shizuoka, (JP) 杉野 男(SUGINO, Dan)(JP/JP) 〒520-01 滋賀県大津市唐崎4丁目2番1号 コーポ唐崎201 Shiga, (JP) 奥島 実(OKUSHIMA, Minoru)(JP/JP) 〒573 大阪府枚方市枚方元町8丁目9番地. Osaka, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 改訂された国際調査報告書 (88) 改訂された国際調査報告書の公開日: 1997年12月24日(24.12.97)</p>													
<p>(54) Title: CANCEROUS METASTASIS INHIBITOR</p> <p>(54) 発明の名称 癌転移抑制剤</p> <p>(57) Abstract A chimeric protein wherein HI-8 which is the C-terminal domain of human urinary trypsin inhibitor (UTI) having a cancer cell metastasis inhibitory effect is bonded to a peptide containing the G domain of urokinase binding specifically to urokinase receptor expressed in a large amount in cancer cells.</p> <div data-bbox="1023 1134 1559 1911"> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Property</th> <th>Value</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sequence size</td> <td>193</td> </tr> <tr> <td>hydrophobicity</td> <td>82 42.49 %</td> </tr> <tr> <td>neutrality</td> <td>57 29.53 %</td> </tr> <tr> <td>hydrophilicity</td> <td>54 27.98 %</td> </tr> <tr> <td>molecular weight</td> <td>21564.13</td> </tr> </tbody> </table> <p>a ... 1-134: amino terminal fragment of urokinase</p> <p>b ... sequence size : 193</p> </div>			Property	Value	Sequence size	193	hydrophobicity	82 42.49 %	neutrality	57 29.53 %	hydrophilicity	54 27.98 %	molecular weight	21564.13
Property	Value													
Sequence size	193													
hydrophobicity	82 42.49 %													
neutrality	57 29.53 %													
hydrophilicity	54 27.98 %													
molecular weight	21564.13													

* (PCT ガゼット No.55/1997 セクション II 参照)

(57) 要約

本発明は、癌細胞転移抑制効果を持つヒト尿トリプシン阻害剤(urinary trypsin inhibitor: UTI)のC末端側ドメイン(domain)であるHI-8と、癌細胞に多量に発現されるウロキナーゼレセプター(urokinase receptor)に特異的に結合するウロキナーゼ(urokinase)のGドメインを含むペプチドを結合したキメラ蛋白質に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	RS	セルビア共和国
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	ジョージア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BF	ブルキナファソ	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	SS	スーダン
BJ	ベナン	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	ST	セント・ヘレナ
BR	ブラジル	IT	イタリア	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	RU	ロシア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	US	アメリカ合衆国	MW	マラウイ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CH	スイス	KR	韓国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギス	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

REVISED
VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57 //
(C12P21/02, C12R1:19), (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS, MEDLINE, CAS ONLINE, JICST File on Science and Technology, GENETYX-MAC/CD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem. 270(14) (1995) Kobayashi H. et al. "Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro" p. 8361-8366	1 - 22
P,X P,A	Acta Obster, Gynaecol. Japan. 48(8) (08. 1996) Kobayashi H. "Mechanism of extracellular matrix disruption by cancer cells and inhibition of infiltration and metastasis by controlling the same" p. 623-632	1 2 - 22
P,X P,A	Biotherapy 10(10) (10. 1996) Shinohara H. et al. "Urinary trypsin inhibitor (UTI) and its application-Inhibition of infiltration and metastasis of cancer by synthetic substance" p. 1359-1365	1 2 - 22
P,X P,A	Ketsueki-Shuyoka 33(4) (10. 1996) Kobayashi H. "Inhibition of infiltration and metastasis by urokinase-trypsin inhibitor conjugate" p. 324-332	1 2 - 22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 11, 1997 (11. 04. 97)

Date of mailing of the international search report

April 22, 1997 (22. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	Experimental Medicine, 14(17) (11. 1996) Kobayashi H. "Control of degradation of extracellular matrix mediated by protease in cancer infiltration and metastasis" p. 2487-2493	1 2 - 22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57 //
(C12P21/02, C12R1:19), (C12N1/21, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C12N15/12, C07K14/435, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/57

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS, MEDLINE, CAS ONLINE, JICST科学技術文献ファイル, GENETYX-MAC/CD

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem. 270 [14] (1995) Kobayashi H. et al 「Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro」 p. 8361-8366	1-22
P, X P, A	日本産科婦人科学会雑誌 48 [8] (08.1996) 小林 浩 「癌細胞の細胞外マトリックス破壊の機序とその制御による浸潤・転移抑制」 p. 623-632	1 2-22
P, X P, A	Biotherapy 10 [10] (10.1996) 篠原 弘光 他 「Urinary trypsin inhibitor (UTI) とその応用 合成物質による癌の浸潤転移抑制」 p. 1359-1365	1 2-22
P, X P, A	血液・腫瘍科 33 [4] (10.1996) 小林 浩 「ウロキナーゼトリプシンインヒビター複合体による癌浸潤・転移の抑制」 p. 324-332	1 2-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.97

国際調査報告の発送日

22.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

印

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	実験医学 14 [17] (11. 1996) 小林 浩 「癌浸潤転移におけるプロテアーゼを介した細胞外マトリックスの分解制御」 p. 2487-2493	1 2-22